

MIKROSZKÓPIKUS GOMBÁK MIKOTOXIN-BONTÓ KÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

PÉTERI ADRIENN ZSANETT

TÉMAVEZETŐK:

DR. VARGA JÁNOS

EGYETEMI DOCENS

DR. VÁGVÖLGYI CSABA

TANSZÉKVEZETŐ EGYETEMI TANÁR

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK
SZEGED
2009**

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3./1. Mikotoxinok jellemzése	9
3./2. Ochratoxinok	14
3./3. Mikotoxinok detoxifikálása	21
3./4. <i>Rhizopus</i> nemzetség jellemzése	31
3./5. <i>Phaffia rhodozyma</i> jellemzése	33
3./6. Az <i>Aspergillus</i> nemzetség jellemzése	36
3./7. Karboxipeptidáz enzimek jellemzése	38
4. CÉLKITŰZÉSEK	40
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	41
5./1.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek	41
5./1.2. A baktérium-transzformáció során alkalmazott törzsek	43
5./2.1. A törzsek tenyésztéséhez felhasznált táptalajok, tápoldatok	44
5./2.2. Pufferek és oldatok	44
5./2.3. A kísérletek során használt vektorok és indítószekvenciák	45
5./2.4. A protoplasztálás és transzformálás során felhasznált elegyek, táptalajok és oldatok	46
5./2.5. Felhasznált egyéb vegyszerek/anyagok	47
5./3. Alkalmazott módszerek	48
5./3.1. Kísérleti módszerek <i>Rhizopus</i> izolátumok esetében	48
5./3.1.1. <i>Rhizopus</i> izolátumok mikotoxin-detoxifikáló képességének vizsgálata	48
5./3.1.2. Ochratoxin A bontási kinetika <i>Rhizopus</i> fajok esetében	48
5./3.1.3. Ochratoxin A-degradációs modellkísérletek búzán	48
5./3.2. Kísérleti módszerek <i>Phaffia rhodozyma</i> esetében	49
5./3.2.1. <i>Phaffia/Xanthophyllomyces</i> izolátumok OTA-bontó képességének vizsgálata	49
5./3.2.2. HPLC-analízis	50
5./3.2.3. OTA-adszorpciós kísérlet	50

5./3.2.4. OTA-bontásért felelős enzim extracelluláris vagy intracelluláris kiválasztódásának meghatározása	51
5./3.2.5. Proteáz- és karboxipeptidáz-inhibitorok hatása az OTA-bontásra <i>P. rhodozyma</i> esetében	51
5./3.3. A <i>cpa</i> gén amplifikálásához alkalmazott módszerek	52
5./3.3.1. Genomi DNS kivonása <i>Aspergillus</i> fajokból	52
5./3.3.2. A polimeráz láncreakció körülményei	52
5./3.3.3. DNS-gélelektroforézis	53
5./3.3.4. DNS izolálása agaróz gélből	53
5./3.3.5. DNS fragmentumok klónozása	53
5./3.3.6. Kompetens sejtek készítése	53
5./3.3.7. Baktériumtranszformáció	54
5./3.3.8. Plazmidtisztítás	54
5./3.3.9. DNS szekvenciák meghatározása és elemzése	54
5./3.3.10. Inverz polimeráz láncreakció körülményei	55
5./3.4. A pN4 vektor építéséhez alkalmazott módszerek	56
5./3.5. A <i>Pichia pastoris</i> expressziós rendszer alkalmazása	56
5./3.5.1. Fehérjetisztítás fermentléből	56
5./3.5.2. Fehérje gélelektroforézis	57
5./3.5.3. Nem transzformáns <i>Pichia pastoris</i> törzsek (KM71H, X-33) tesztelése OTA-bontásra	57
5./3.5.4. <i>Pichia pastoris</i> transzformáns törzsek (KM71H: 1/1, 1/2, 3/1, 3/2) tesztelése OTA-bontásra	57
5./3.6. <i>Aspergillus</i> fajok pANCPA vektorral történő transzformálása	58
5./3.6.1. A pANCPA vektor építéséhez felhasznált módszerek	58
5./3.6.2. <i>Aspergillus</i> törzsek protoplasztálása	58
5./3.6.3. Nem transzformáns <i>Aspergillus</i> törzsek MIC-értékeinek meghatározása hygromicin B-re	58
5./3.6.4. <i>Aspergillus</i> fajok transzformálása	58
5./3.6.5. Nem transzformáns és transzformáns <i>Aspergillus</i> törzsek tesztelése OTA-bontásra	59
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	60
6./1.1. <i>Rhizopus</i> izolátumok mikotoxin-detoxifikáló képességének vizsgálata	60
6./1.2. Ochratoxin A-bontási kinetika <i>Rhizopus</i> fajok esetében	61

6./1.3. Ochratoxin A-degradációs modellkísérlet búzán	62
6./2.1 <i>Phaffia/Xanthophyllomyces</i> izolátumok ochratoxin A-bontó képességének elemzése	66
6./2.2 A <i>Phaffia rhodozyma</i> ochratoxin A-adszorpciós képessége	69
6./2.3 Proteáz és karboxipeptidáz inhibitorok hatása ochratoxin A bontásra <i>Phaffia rhodozyma</i> esetében	71
6./3. A <i>cpa</i> kódoló gén klónozása <i>Aspergillus niger</i> (CBS 120.49 / N400) fajból	74
6./4. A <i>cpa</i> gén expressziója <i>Pichia pastoris</i> transzformációs rendszerben	79
6./4.1. A <i>cpa</i> gén vektorba történő beillesztése	79
6./4.2. A nem transzformáns <i>Pichia pastoris</i> törzsek: KM71H és X-33 (vadtypus) tesztelése ochratoxin A-bontásra	80
6./4.3. <i>Pichia pastoris</i> transzformáns izolátumok (KM71H: 1/1, 1/2, 3/1, 3/2) tesztelése ochratoxin A-bontásra	82
6./5. <i>Aspergillus</i> fajok pANCPA vektorral történő transzformálása	86
6./5.1. A pANCPA vektor elkészítése	86
6./5.2. Nem transzformáns <i>Aspergillus</i> törzsek minimális gátló koncentráció (MIC) értékeinek meghatározása hygromicin B antibiotikumra nézve	89
6./5.3. A kiválasztott <i>Aspergillus</i> törzsek transzformálása és tesztelése ochratoxin A-bontásra nézve	89
7. ÖSSZEFOGLALÁS	95
8. SUMMARY	99
9. IRODALOMJEGYZÉK	102
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	116

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATCC	American Type Culture Collection, USA
a_w	vízaktivitási érték
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands
CCFC	Canadian Collection of Fungal Culture, Canada
DMSO	dimetil-szulfoxid
DON	deoxynivalenol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	etilén-glikol-bisz(béta-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
ELISA	enzymelinked immunosorbent assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FAO	Food and Agriculture Organisation
FRR	CSIRO Food Research Culture Collection, Australia
HPLC	high-performance liquid chromatography
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
ITS	internal transcribed spacer
MOPS	3-N-morfolin-propánszulfonsav
MUFS	Department of Microbiology and Biochemistry, The University of the Orange Free State, South Africa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRRL	Agricultural Research Service Culture Collection, USA
OD	optikai denzitás
ORF	open reading frame (nyitott leolvasási keret)
OTA	ochratoxin A
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PEG	polietilén-glikol
RAPD	random amplified polymorphic DNA (random amplifikált DNS-polimorfizmus)
rDNS	riboszómális DNS

RFLP	restriction fragment length polymorphism (restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus)
RPM	percenkénti fordulatszám
SDS	nátrium-lauril-szulfát
SZMC	Szeged Microbial Collection, Hungary
TJM	Dr. Themis J. Michailides, University of California, USA
TLC	thin layer chromatography (vékonyréteg-kromatográfia)
TRIS	trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
UHF	UTHSCSA/Fungal Testing Laboratory, USA
VLP	Virus like particle (vírusszerű partikulum)
WRLCN	Welcome Bacterial Collection, Beckenham, UK
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid
YNB	élesztő nitrogénforrás

2. BEVEZETÉS

A mikotoxinok olyan, különböző fonalaszombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, amelyek magasabbrendű élőlények, mint például az ember és haszonállatai esetében különböző megbetegedéseket, úgynevezett **mikotoxikózisokat** okozhatnak. A korábban leírt mikotoxikózisok pontos eredete nem mindig vált később ismertté, részben a korabeli leírások pontatlansága, részben pedig a vegyes mikóta termelte változó összetételű toxinelegy hatása miatt. Mostanára a mezőgazdasági termékek megfelelő tárolása és bevizsgálása jelentősen csökkentette a mikotoxikózisok előfordulását, de a mikotoxinok még mindig problémát jelentenek világszerte. A fejlődő és a fejlett országokban, ahol a tárolási feltételek nem megfelelőek és a klíma is elősegíti a toxinok termelődését, szükség lenne az élelmiszerek és takarmányok toxinszennyezettségének csökkentésére.

A legújabb kutatások és vizsgálati eredmények is azt mutatják, hogy a mikotoxinok egyre nagyobb figyelmet érdemelnek. Rendkívül súlyos akut és krónikus humán egészségkárosító hatásuk mellett gazdasági kihatásuk is jelentős: a termés mennyiségét és minőségét is rontják. A mikotoxinnal szennyezett takarmány az állatállomány fejlődését, szaporodását, egészségét negatívan befolyásolja. A megtermelt mezőgazdasági javak exportképességét a mikotoxin-szennyezettség csökkenti, mely a nemzetgazdaság egészére hatással van. Gyakran előforduló probléma a hamisítás, csalás, például a kísérő dokumentumok meghamisítása vagy a termékek illegális keverése. Erre példa az alacsony határértékű termék összekeverése magas mikotoxin-tartalmú élelmiszerral, mint a kávé, kakaó vagy a fűszerpaprika esetében (Élelmiszervizsgálati Közlemények, 2007).

Az egészséges táplálkozás jegyében előtérbe került vegyszermentes, úgynevezett öko- vagy biotermelés is kedvezhet a penészgombák kártételének és a mikotoxinképződésnek. Ezért lenne jelentős biológiai eljárásokkal elérni a szennyezettség csökkentését. A WHO a legveszélyesebb szennyezőanyagokat tartalmazó prioritási listán a következő mikotoxinokat tünteti fel: aflatoxinok, ochratoxin A (OTA), patulin, fumonizinek. Ezek közül munkánk során elsősorban az OTA-ra koncentráltunk. Mivel mérsékelt égővi körülmények között is termelődik, így az ochratoxin-szennyezettség hazai viszonylatban is figyelmet érdemel.

A dolgozat célja, hogy bemutassa azokat a kísérleti eredményeket (és ezek irodalmi hátterét), amelyeket az OTA biológiai lebontásával kapcsolatban elértünk. Az élelmiszerek és egyéb mezőgazdasági termények mikotoxin-tartalmának csökkentésére a biológiai

eljárások alkalmazása az egyik legígéretesebb lehetőség. Ennek alapfeltétele a toxinokat hatékonyan bontó mikroorganizmusok izolálása, jellemzése, majd lehetőség szerint a toxin bontására képes, a vad izolátumnál kedvezőbb tulajdonságú törzs létrehozása. Ennek egyik lehetséges módja a toxin lebontásában szerepet játszó gén(ek) azonosítása, jellemzése, esetlegesen expressziójának befolyásolása. Munkánk során ebbe az irányba igyekeztünk megtenni a megfelelő lépéseket, hogy egy új, a környezet és az ember számára kíméletesebb biológiai eljárást fejlesszünk ki.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3./1. MIKOTOXINOK JELLEMZÉSE

3./1.1. Mikotoxinok definíciója

A mikotoxinok a gombák – elsősorban penészgombák – általában extracellulárisan kiválasztódó másodlagos anyagcseretermékei (a kalapos gombák toxinjai nem tartoznak ide). Erős fiziológiai ill. patológiás hatásúak, az emberbe és a gerinces haszonállatokba főleg enterálisan bejutva fejtik ki káros hatásukat. Ez a lényegében a magasabbrendű eukariótákhoz kötődő meghatározás azonban nem zárja ki az alacsonyabbrendű élőlényekre (alga, egysejtű, gomba, prokarióta stb.) gyakorolt hatást - ebből eredően antibiotikus hatású vegyületek is vannak köztük.

3./1.2. Mikotoxin-termelő gombák és a toxinképzés feltételei

A mikroszkopikus gombák a természetben - így a takarmányokon is - nagy számban előfordulnak. Szerepük a szerves anyagok lebontásában nélkülözhetetlen. Növekedésük, szaporodásuk folyamán a környezetükből felvett szerves tápanyagok felhasználásával olyan anyagokat szintetizálnak, amelyek a gombatest természetes alkotó elemei (primer anyagcsere). A fejlődés és a növekedés bizonyos szakaszaiban, vagy akár az előbbi folyamattal párhuzamosan is ún. másodlagos anyagcsere is zajlik, amelynek során olyan, rendszerint bonyolult kémiai szerkezetű anyagok keletkeznek, amelyekre a gombának nincs feltétlenül szüksége, és testük felépítéséhez nélkülözhetők. Ezek pontos szerepét, rendeltetését nem ismerjük, de közülük sok jelentős biológiai aktivitással rendelkezik. Az általuk okozott megbetegedést mikotoxikózisnak nevezzük, melyet elsősorban a penészgombák okoznak. A kalapos gombák előfordulása a takarmányozásban elhanyagolható, az élesztőgombákról pedig több száz törzs vizsgálata alapján tudjuk, hogy nem termelnek toxikus metabolitokat.

A toxintermelő gombák közül azokat, amelyek szaporodásukhoz magasabb nedvességtartalmat (20% fölött) igényelnek, szántóföldi penészeknek nevezzük, azokat pedig, amelyek ennél alacsonyabb víztartalom mellett is képesek szaporodni, raktári penészeknek. Ez a csoportosítás azon alapszik, hogy a takarmánynövények nedvességtartalma a betakarítással egyidejűleg jelentősen lecsökken. Annak ellenére, hogy a mindkét csoportba tartozó gombák a szántóföldön, a talajban és a raktárakban is megtalálhatók, az elszaporodásukhoz a megfelelő feltételeket az egyik csak a vegetációs periódusban, a másik pedig a tárolás során is megtalálja. Természetesen ezt a csoportosítást

nem lehet mereven alkalmazni, mert pl. a *Fusarium* fajok - amennyiben túlélik a betakarítást és a tárolást - a raktározás során is képesek tovább szaporodni.

Mindkét csoportba fontos toxintermelők tartoznak, gyakorlati szempontból azonban különösen az alábbiak fontosak:

- raktári penészek: *Aspergillus* és *Penicillium* fajok
- szántóföldi penészek: *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Stachybotrys* fajok.

A mikotoxinok keletkezhetnek már a szántóföldön, de a raktározás során is. Általánosan érvényes, hogy ugyanazt a toxint más-más gomba is képes előállítani, de egy gombafaj egyidejűleg több mikotoxint is termelhet. Több százra tehető az eddig meghatározott gombatoxinok száma, közülük azonban viszonylag csak kevésnek van nagyobb gyakorlati jelentősége. A nagyobb gyakorlati jelentőséggel rendelkezők a következők:

- raktári penészek toxinjai: aflatoxinok,
ochratoxin A,
citrinin,
patulin,
rubratoxin B.
- szántóföldi penészek toxinjai:
 - Fusarium*-toxinok: zearalenon (F-2 toxin),
trichotecének (T-2 toxin,
diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol,
nivalenol, fusarenon-X)
fumonizinek
 - Stachybotrys chartarum*: satratoxinok (makrociklikus trichotecének).
 - Claviceps* fajok: ergot alkaloidok

A gomba szaporodásához a kellő víztartalom mellett megfelelő tápközegre, oxigénre és meghatározott hőmérsékletre van szükség. A szaporodás és a toxintermelés optimális feltételei rendszerint nem azonosak. Jelentős eltérés főleg a hőmérséklet iránti igényben mutatkozik. Egyes toxinok (aflatoxinok) esetében magas, más toxinoknál (egyes *Fusarium* toxinok) alacsony, néha fagypont körüli hőmérséklet szükséges a termelődésükhöz.

3./1.3. Mikotoxinok csoportosítása

A mikotoxinok csoportosítását megnehezíti, hogy nagyszámú toxin és gombafaj ismert, továbbá az is, hogy az egy gombanemzetségen belüli fajok is termelhetnek eltérő kémiai szerkezetű toxinokat, míg taxonómiailag távol álló fajoknál is termelődhetnek azonos toxinok. Ezek figyelembevételével csoportosításuk többféle lehet:

1. A mikotoxinok kémiai összetétele - így bioszintézisük is - rendkívül sokféle lehet. A legelfogadottabb csoportosítás a mikotoxinok *bioszintézisének prekurzorai* alapján történő felosztás (Smith és Moss, 1985). Ez a csoportosítás azonban jelenleg nem teljeskörű, hiszen számos mikotoxin bioszintézisének útja még nem ismert. A mikotoxinok egy része acetyl-KoA és malonil-KoA kondenzációjából vezethető le. A mevalonát rendszerből származó szeszkviterpén-típusú mikotoxinok kémiaailag is jól körülhatárolható egységet képeznek. Az aminosavakból származtatható toxinok csoportja heterogén, mivel N-heterociklikus vegyületeket és ciklikus polipeptideket is tartalmaz.
2. A toxinok *kémiai szerkezetéből* adódó rokonság alapján való rendszerezés.
3. A magasabbrendű élőlényekre gyakorolt *farmakológiai hatás* alapján, rangsorolva az élettani veszélyességet (1. és 2. táblázat). Átfedést okozhat, hogy egy adott mikotoxinnak többféle hatása is lehet.

1. táblázat: Néhány mikotoxin hatása

Hatás	Fontosabb mikotoxinok
hepatotoxikus, hepatokarcinogén	aflatoxinok, sterigmatocisztin
teratogén	aflatoxinok, ochratoxinok, rubratoxin B
neurotoxikus	citreoviridin, patulin, ciklopiazonsav
nefrotoxikus	ochratoxinok, citrinin, viomellein
immunszuppresszív	aflatoxinok, ochratoxinok, trichotecének
dermatotoxikus	trichotecének
emetikus	vomitoxin (deoxinivalenol)
ösztrogén	zearalenon
tremorgén	penitrem A, fumitremorgének
fotoszenzitizedáló	sporidezminek, viomellein, xantomegnin
hallucinogén	ergotoxinok

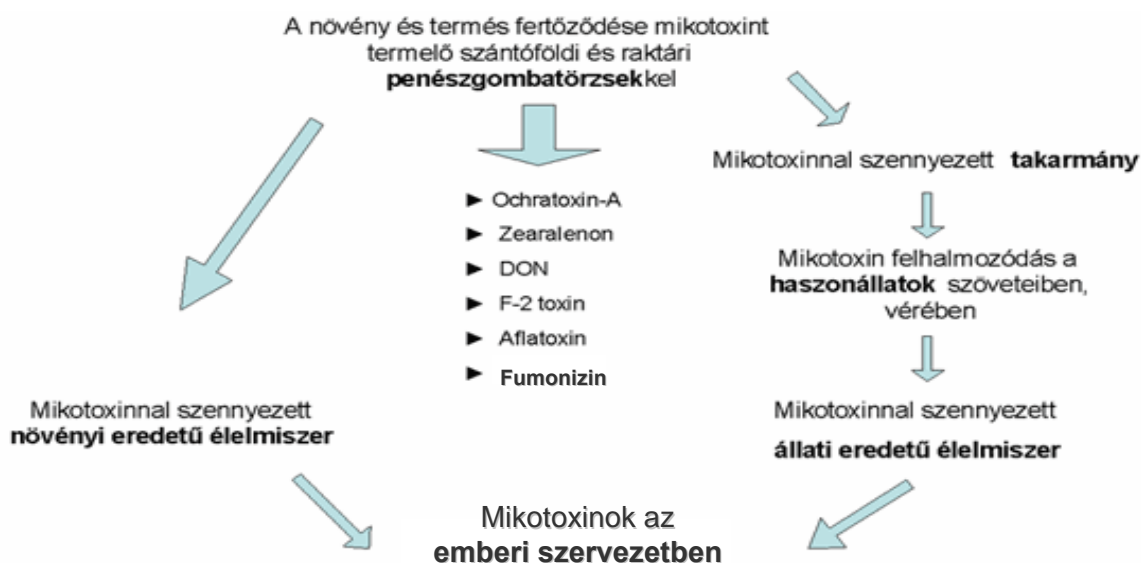
2. táblázat: Néhány mikotoxin által előidézett emberi megbetegedés

Szindróma	A felelős mikotoxin	Termelő faj (példa)
Alimentáris toxikus aleukia	trichotecének	<i>Fusarium</i> sp.
Ergotizmus ("Szent Antal tüze")	ergotamin, ergometrin	<i>Claviceps</i> sp.
Balkáni endémikus nefropátia	glükoproteinek	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> sp.
"Sárga rizs betegség"	citrinin, citreoviridin	<i>Penicillium</i> sp.
Kardiális beri-beri	citreoviridin	<i>Penicillium</i> sp.
Májrák	aflatoxinok	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
"Onyalai" szindróma (endémikus hematológiai rendellenesség)	tenuazonsav	<i>Phoma sorghina</i>
"Vörös penész" ("red mold", "staggering grains", "Taumelbrot")	trichotecének	<i>Fusarium</i> sp.
Kaschin-Beck szindróma (osteochondroarthrosis deformans)	trichotecének	<i>Fusarium</i> sp.
Reye-szindróma	aflatoxinok	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Nyelőcsőrák	fumonizinek	<i>Fusarium</i> sp.
Korai telarche	zearalenon	<i>Fusarium</i> sp.

3./1.4. A mikotoxinok útja a szervezetben

A mikotoxinok különböző úton juthatnak be az emberi szervezetbe, elsősorban növényi és állati táplálékforrásokon keresztül (1. ábra). A szervezetbe jutott toxin az emésztési folyamatokkal szemben is meglehetősen ellenálló. A toxin jelentős része áthalad a bélsatornán és a bélsárral kiürül. A felszívódás a vékonybélből történik, majd a toxinnak egy része ismét visszajut a bélsőbe, és csak a másik - rendszerint a kisebb - része jut a vérkeringésbe, ahonnan a tejjel és a vizelettel kiürül a szervezetből. A tejmirigy és a vese a toxinokat általában koncentrálna, ezért reziduum-képződéssel itt számolhatunk. Az izomzatban csak a keringésben lévő mennyiségből juthat.

A szervezetben a gombatoxinok bizonyos átalakuláson mennek keresztül. Ez az átalakulás meghatározott kémiai sémák szerint történik: közömbösítés, oxidáció, redukció, bontás, szintézis. Ezt a folyamatot metabolizációnak nevezzük. Néha előfordul, hogy a metabolizáció során toxikusabb vegyület keletkezik, mint az eredeti volt: ezt nevezzük toxikus metabolizációnak, pl. zearalenonból zearalenol keletkezése.



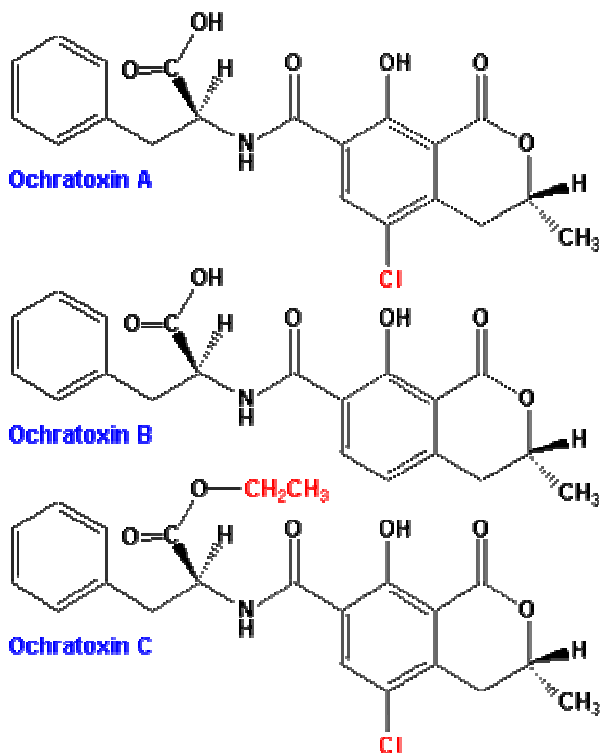
1. ábra: Mikotoxinok lehetséges útja az emberi szervezetig (Kovács F, 2001).

3./2. OCHRATOXINOK

1965-ben a penészgombák másodlagos anyagcseretermékeinek szisztematikus vizsgálata során *Aspergillus ochraceus* szűrléséből erősen nefrotoxikus és hepatotoxikus vegyületeket izoláltak, melyeket ochratoxinoknak neveztek el.

3./2.1. Szerkezeti felépítésük

Kémiai szerkezetük alapján dihidrokumarinhoz kapcsolódó béta-fenilalanin vegyületek. Jellemző rájuk a klóratom jelenléte az OTA és észterei esetében. Az ochratoxin B és észterei nem tartalmaznak klór atomot (2. ábra). Az ochratoxinok közepesen stabil molekulák, melyek túlélnek a legtöbb élelmiszerfeldolgozási folyamatot, mint pl. a sütést és a főzést.



2. ábra Az ochratoxinok szerkezete

3./2.2. Ochratoxin-termelő gombák

Az ochratoxin-termelő fajok közül a leggyakoribbak a *Penicillium* fajok hideg klímájú régiókban, míg a meleg és trópusi éghajlaton az *Aspergillus* fajok a főbb termelők. Az *Aspergillus* izolátumok általában mind OTA-t, mind ochratoxin B-t, míg a *Penicillium*

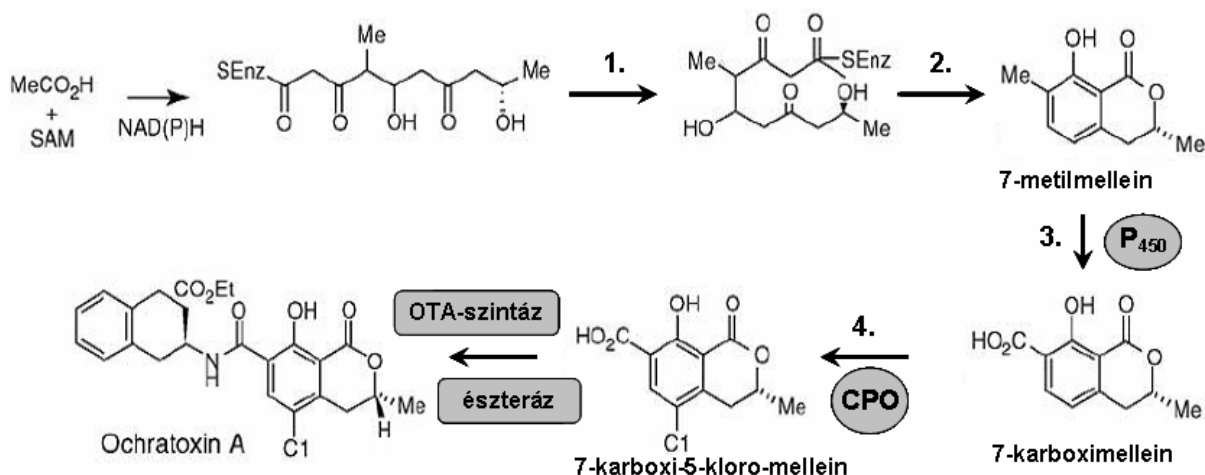
fajok csak OTA-t termelnek. Nagy mennyiségben OTA-termelő *Aspergillus* fajok (*Circumdati* szekció) az *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. westerdijkiae*, *A. sulphureus* és *Neopetromyces muricatus* (Frisvad és mtsai. 2004). A legfontosabb OTA-termelő fajok, melyek potenciálisan szennyezhetik a kávé, rizst, italokat és élelmiszereket: *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* és *A. steynii*. Másik fontos OTA-termelő csoport a fekete *Aspergillus* fajok (*Nigri* szekció), ebben a szekcióban a legfontosabb OTA-termelő faj az *A. carbonarius*, mely nem termel ochratoxin B-t, ellentétben az *A. niger*-rel mely mind OTA-t, mind ochratoxin B-t termel. Amíg a legtöbb *A. carbonarius* OTA-termelőnek bizonyult, addig az *A. niger* törzsek 5-15 %-a termel OTA-t. Ezen kívül még két fekete *Aspergillus* faj, az *A. lacticoffeatus* és az *A. sclerotium* is OTA-termelőnek bizonyult (Samson és mtsai. 2004). A fekete *Aspergillus* fajokat összefüggésbe hozzák a kávébab, szőlő és fűszerek OTA-szennyezettségével.

A korai 70-es években számos *Penicillium* faj OTA-termelését leírták, (Ciegler és mtsai. 1972). Ezek közül az OTA-termelő *P. viridicatum* és *P. cyclopium* fajokat később átsorolták a *P. verrucosum* fajba (Pitt 1987). Habár Pitt (1987) javaslata szerint csak a *P. verrucosum* az egyedüli OTA-termelő faj a *Penicillium*-ok közül, később Bridge és mtsai. (1989) találtak néhány OTA-termelő *Penicillium* izolátumot a *P. expansum*, *P. aurantiogriseum* (*P. solitum*) és *P. atramentosum* fajok esetében. Mostanság néhány kávé-endofita izolátumról (*P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii*, *P. oxalicum*), (Vega és mtsai. 2006) és néhány szőlőről származó izolátumról (*P. radicum* és *P. rugulosum*) állítják, hogy felelősek lehetnek az OTA termeléséért (Torelli és mtsai. 2006).

3./2.3. Ochratoxinok bioszintézise

Általában a mikotoxin-szintetizáló géneket a növekedési paraméterek erősen szabályozzák, és csak bizonyos körülmények között aktiválódnak. Az OTA bioszintézisének útvonala még nem tisztázott néhány gombafajban, de feltehetőleg az izokumarin-csoport (pentaketid forma) egy poliketid-szintézis útvonalon keresztül acetátból és malonátból áll össze (Moss 1998). Az OTA heterociklikus része strukturálisan hasonló a melleinhez, mely egy közönséges gombavegyület. A klóratom az izokumarin-vázhoz egy klór-peroxidáz enzim segítségével kapcsolódik. A fenilalanin a sikimisav-útvonalból származik, egy karboxil-csoporton keresztül kapcsolódik az izokumarin-vázhoz (Edwards és mtsai. 2002, Moss 1998), (3. ábra).

Az OTA-bioszintézisben résztvevő géneket (poliketid-szintázok, klór-peroxidáz, OTA-szintáz), melyek a résztvevő enzimeket kódolják, már azonosították néhány fajban (pl.: *Penicillium nordicum*, *Aspergillus* fajok) (Geisen és mtsai. 2004, 2006; O'Callaghan és mtsai. 2003; Dobson és O'Callaghan 2004). A *Penicillium nordicum*-ot tekintve már bebizonyosodott, hogy az OTA-termelésért felelős gének klaszter-ben helyezkednek el.



3. ábra: Egyszerűsített ochratoxin-bioszintézis útvonal (Moss 1998; Simpson 1995). A számokkal ellátott nyílak a főbb enzimatis lépéseket jelölik: **1.** Gyűrűvé záródás, **2.** Aldol-csoportok dehidratálása, **3.** Oxidáció, **4.** Klórtartalmú oldallánc létrehozása.

3./2.4. Biológiai hatás - ochratoxikózisok

A csoporton belül elsősorban a klórtartalmú származékok akut toxicitása nagy, hatásuk vesekárosításban, a vesetubulusok nekrozisában nyilvánul meg. A klórmentes származékok mérgező hatása egy nagyságrenddel kisebb. A több hasonló metabolit közül a legnagyobb mennyiségben az OTA képződik, amely biológiailag is a legaktívabb. A legtöbb faj esetében az OTA a gyomorból szívódik fel savas tulajdonságának köszönhetően. Szintén felszívódik még a vékonybélből és részben a jejunum (éhbél) első szakaszában. Nem kérődző fajok (pl. sertés, baromfi, nyúl és patkány) esetében az elfogyasztott OTA közel fele szívódik csak fel (Galtier és mtsai. 1981). A felvett OTA széteszik a vérben keresztül, főleg a vesékben és alacsonyabb koncentrációban a máj, izom és zsírszövetben. Ennek egy része metabolizálódik egy nem-toxikus ochratoxin α -ra és más, kevésbé toxikus kisebb egységekre, a különböző fajokban eltérő arányban, jelentős része pedig változatlanul kiürül a szervezetből. Kimutatták az OTA-ról, hogy hozzákötődik a vérben lévő fehérjékhez, pl. a

szérumalbuminhoz, melynek hosszú a féléletideje a testben. Az OTA passzívan szívódik fel a bélrendszeren keresztül (enterohepatikus újrahassznosítás révén) és aktívan a vesékben (Marquardt és Frohlich 1992). A toxin főleg a vizelettel távozik a szervezetből, kisebb mértékben pedig a széklettel ochratoxin α és OTA formájában.

A sertések mikotoxikus eredetű nefropátiáját először Dániában és Svédországban írták le. A betegség a skandináv országokban endémiásan fordul elő. Legszembetűnőbb a veseelváltozás: a vese rendszerint megnagyobbodott, világosabb színárnyalatú. Úgy tűnik, hogy a nőivarú egyedekben gyakoribb. Az ochratoxin okozta sertésnefropátiát valamennyi európai országban, köztük Magyarországon is észlelték.

Csirke- és pulykaállományokban is leírták a megbetegedést: a vesék megnagyobbodása és fakó színe feltűnő volt, szövettanilag a proximális tubulusokban hámléhalást figyeltek meg. Tömeges elhullást okozott. Jellemző inkább a csökkenő testtömeg-gyarapodás és a romló takarmányfogyasztás.

Ismeretes egy „balkáni endémiás nefropátia” elnevezésű betegség, amelyet Bulgária, Jugoszlávia és Románia esetében csaknem kizárólag a vidéki lakosság körében figyeltek meg. A balkáni endémiás nefropátia a 30-50 év közötti életkor krónikus megbetegedése, amely lassú lefolyása mellett halálos kimenetelű. A vese mérete szembetűnően kisebb, a vesefunkció súlyosan károsodott. Szövettanilag jellemző vese-elváltozások: a vesecsatornácskák hámlájának elfajulása intersticiális fibrózissal és a kéregállomány felső rétegében a glomerulusok hialinos degenerációja. A betegség endémiásan jelentkezik és a nők gyakrabban betegednek meg, mint a férfiak. Megállapították, hogy az élelmiszerek ochratoxin-kontaminációja lényegesen magasabb - 12,8%-os OTA-szennyezettség - azokban a régiókban, ahol a humán nefropátia endémiásan előfordul. A kontroll körzetekben (nem endémiás területek) 1,6%-os toxinszennyezettséget találtak. A végső bizonyíték az volt, amikor a megbetegedett emberek véréből kimutatták az ochratoxint (Krogh és mtsai. 1977).

Orális kísérletekben egereken és patkányokon letesztelték az OTA karcinogén hatását. A kezelés hatására egerekben mindkét nemnél megnövekedett az esélye a hepatocelluláris tumoroknak, és összefüggés volt kimutatható a vese-sejtes adenomával és karcinómával, melyet már leírtak hím egerek és patkányok esetében OTA-val végzett orális vizsgálatok során (Clark és Snedeker 2006). Egyértelmű tény, hogy az OTA a vesére karcinogén hatással van hím patkányokban, bár a hatás pontos mechanizmusa ismeretlen. Számos adat ismerteti, hogy nem egy epigenikus DNS-nemreaktív mechanizmusról van szó, és nem is egy olyan DNS-reaktív mechanizmusról, mely magába foglalja a direkt kapcsolatot az

OTA és a DNS között (Arbillaga és mtsai. 2007b, Pfohl-Leszkowitz és Manderville 2007). Habár a DNS-OTA formációt számos alkalommal demonstrálták már (Faucet és mtsai. 2004, Pfohl-Leszkowitz és Castegnaro 2005), több kutatócsoport állítja, hogy az oxidatív stressz a kulcsfaktor az OTA toxicitásának és karcinogenitásának epigenikus mechanizmusában (Arbillaga és mtsai. 2007a, Schilter és mtsai. 2005).

1993-ban a Nemzetközi Ügynökség a Rák Kutatásért (International Agency for Research on Cancer, IARC) az OTA-t, mint lehetséges humán karcinogént a 2B. csoportba sorolta és azt a következtetést vonta le, hogy elegendő bizonyíték van az állatkísérletekből az OTA karcinogén hatására viszont hiányosak a bizonyítékok az OTA karcinogén hatásáról az emberre nézve (IARC 1993). A dózisok, amiket a karcinogén vizsgálatokban használtak rágsálók esetében, magasabbak voltak, mint az a dózis mely nefrotoxicitást vált ki. Más szempontból az OTA állatokra és sejtkultúrákra gyakorolt lehetséges másodlagos hatásai: glikogén-mobilizáció csökkentése (Huff és mtsai. 1979), hematológiai hatások (Gupta és mtsai. 1979), enteritisz (Kanisawa és mtsai. 1990), lencse ízületi tok deformitások (Futamura és mtsai. 1988), módosult karotinoid-metabolizmus szárnyasokban (Schaeffer és mtsai. 1987) és takarmány-visszautasítás sertés és pulyka esetében (Burditt és mtsai. 1984).

3./2.5. Ochratoxinok előfordulása mezőgazdasági termékekben

Számos mezőgazdasági termékben detektáltak már ochratoxinokat, mint pl.: gabonafélékben, kávébab-, kakaó-, fűszer-, szójabab-, földimogyoró-, rizs-, kukorica-, füge- és szőlőmintákban (Varga és mtsai. 2001a). Az ochratoxin-termelő mikroorganizmusok általában raktári (post-harvest) romlást okoznak, viszont ezek a fajok csak részben felelősek az OTA-szennyezettségért. A *Penicillium verrucosum*-ot gyakran izolálják gabonafélék felületéről, mint szántóföldi (pre-harvest) kártevőt, mely felelős lehet az OTA-szennyezettségért (Miller 1995). Mostanában merült fel, hogy az OTA-szennyezettség a zöld kávébab esetében is a tárolás előtti időszakhoz köthető (Bucheli és mtsai. 1998).

Az OTA-t termelő *Penicillium* fajokat leggyakrabban a tárolt gabonafélékkel és fermentált termékekkel hozzák összefüggésbe, míg az *Aspergillus* fajok főleg a kávébabot, fűszereket, kakaóbabot, szójababot, földimogyorót, rizst és kukoricát szennyeznek (Moss 1996). OTA-val szennyezett élelmiszerek (gabonafélék, zöld kávébab, penészes sajtok, hal, tejpor, kenyér, fűszerek) komoly egészségügyi problémákat okoznak az egész világon. A szennyezett zöld kávébab különösen fontos, mivel az OTA nem teljesen bomlik le a

pörkölési eljárás alatt (Tsubouchi és mtsai. 1987). Néhány vizsgálat szerint Közép- és Kelet-Európa (Magyarország, Szlovákia, Oroszország és Csehország) kereskedelmi instant kávé mintái sokkal jobban szennyezettek OTA-val mint, Európa más részein és az USA-ban (Pittet és mtsai. 1996). A szennyezettség mértéke a késői kilencvenes években jelentősen lecsökkent hazánkban (Varga és mtsai. 2000). A legtöbb kávérakomány, melyekben a megengedett határértéknél jóval nagyobb volt a szennyezettség mértéke, Afrikából (Burundi, Zaire, Elefántcsontpart és Uganda) jött. Ma már csak 0-2 kávérakomány kifogásolható a hivatalos határértéknél nagyobb szennyezettsége miatt (Varga és mtsai. 2000). Szintén detektáltak OTA-t sörökben (Degelmann és mtsai. 1999, Varga és mtsai. 2005), testfolyadékokban, illetve állati és ember vesében (Gareis és mtsai. 1988, Kovács és mtsai. 1995, Xiao és mtsai. 1996, Solti és mtsai. 1997). Borokban először Zimmerli és Dick (1995) detektált OTA-t, melyet azóta más szőlőből származó termékekből is kimutattak (Battilani és mtsai. 2003, Varga és Kozakiewicz 2006).

3./2.6. Élelmezés-egészségügyi határértékek

A mikrogombák és a mikotoxinok jelenléte nem hárítható el maradéktalanul. A mikotoxin azon mennyiségét, mely egészségügyi szempontból még elfogadható mértékben fordul elő az élelmiszerben, és még lehetővé teszi az élelmiszer elfogyasztását, a **határérték** fejezi ki. Az élelmezés-egészségügyi határértékek - együtt a minőségi követelményekkel - az élelmi nyersanyagaink és élelmiszereink tárolásra, feldolgozásra és fogyasztásra való alkalmasságát szabályozzák, s így a megelőzés feladatát teljesítik. Mindezt rendeletek és az egyes termékekre vonatkozó szabványok rögzítik.

A határérték megállapítása toxikológiai állatkísérletekből indul ki, melyek feltételeit - mint pl. az állatfajokat, az állatok számát, korát, nemét, az adagolás módját, a megfigyelésre kerülő paramétereket, az értékelés módját, stb. - nemzetközi megállapodások rögzítik. Meg kell állapítani elsősorban az adott toxinnak azt a szintjét, mely huzamos fogyasztás mellett sem okoz káros elváltozást. Ezen adatokból - az ember esetleges nagyobb érzékenysége, sőt a gyermekek és érzékenyebb egyének fogyasztási lehetőségeire való tekintettel - számítják ki a **napi bevihető mennyiséget** (acceptable daily intake, ADI mg/kg testtömeg/nap). Az egy-egy élelmiszerre vonatkozó határértéket az ADI-értékekből számítják ki, az élelmiszer fogyasztásának gyakoriságát és átlagos napi fogyasztását figyelembe véve.

Potenciális veszélyt jelent az OTA mind az emberekre, mind az állatokra, ennél fogva számos ország vezetett be szabályokat a határértékekre, hogy megakadályozzák az

élelmiszerek és tápanyagok jelentős OTA-szennyezettségét. 2003-ban 100 ország rendelkezett mikotoxin-szabályozással (FAO 2004), ezek közül 37 ország szabályozza az OTA-szintet a mezőgazdasági termékekben. Javasolt értékek OTA-határértékekre: 1–5 µg/kg gyermek-élelmiszerekre, 2–50 µg/kg élelmiszerekre, 5–300 µg/kg állati takarmányokra. Az Európai Unión belül számos ország rendelkezik saját szabályzattal/rendelettel az OTA és más mikotoxinok megengedett szintjéről az élelmiszerekben, pl.: Finnország és néhány angliai szupermarket saját OTA-kontrollt és határértéket dolgozott ki, mely alacsonyabb lehet, mint 0,5 µg/kg.

Az Európai Unión belül a maximális tolerálható OTA-szintet az élelmiszerekben, mint pl.: gabonafélékben, fűszerekben, kávéban a 3. táblázat foglalja össze. Ezen kívül – amióta fény derült arra, hogy az OTA toxikus az állatokra és az emberekre – az Európai Unión belül számos ország szabályozza az állati takarmányok OTA-szintjét is, más mikotoxinokkal (DON, zearalenon, fumonizinek) együtt (2006/576/EC).

3. táblázat: Az Európai Bizottság szerinti megengedett határértékek ochratoxin A-ra különböző élelmiszerekben. (Commission Regulation (EC) No.123/2005 of 26 January 2005)

Termékek	Maximum értékek (µg/kg)
Nyers gabonafélék (beleértve a nyers rizst és hajdinát)	5
Minden gabonából származó termék (beleértve feldolgozott gabonatermékeket és a direkt emberi fogyasztásra szánt gabonaféléket)	3
Aszalt szőlő, gyümölcsök (ribizli, mazsola, magtalan mazsola)	10
Pörkölt kávébab és darált kávé kivéve az instant kávé	5
Instant kávé (oldható/gyors kávé)	10
Borok (vörös, fehér és rosé) és más bor- és/vagy szőlőmust alapú italok	2
Szőlőlevelek, szőlőlét tartalmazó más italok, beleértve a szőlőnektárt és koncentrált szőlőlét	2
Szőlőmust és koncentrált szőlőmust és a direkt emberi fogyasztásra szánt mustok	2
Bébi ételek és a feldolgozott gabona-alapú élelmiszerek csecsemőknek és kisgyermekeknek	0,5
Diétás élelmiszerek speciális kezelési szándékkal, speciálisan gyermekek számára	0,5

3./3. MIKOTOXINOK DETOXIFIKÁLÁSA

A mikotoxinok a gombák másodlagos anyagcseretermékei, melyek állatokra és emberekre nézve egyaránt ártalmasak. Az állati takarmányok mikotoxin-szennyezettsége világméretű problémát jelent: az állatokat súlyosan megbetegíthetik, és befolyásolják a termelékenységet. Gazdasági szempontból a legfontosabb, a takarmányt és az élelmiszereket szennyező mikotoxinok az aflatoxin, OTA és a patulin – ezeket főként *Aspergillus* és *Penicillium* fajok termelik -, valamint a trichotecének, a zearalenon és a fumonizin – utóbbiak *Fusarium* toxinok. A mikotoxin-termelő gombák a mezőgazdasági terményeket szennyezhetik a szántóföldön (pre-harvest kártevők), a raktározás során (post-harvest kártevők) vagy a feldolgozás alatt. A mikotoxinok által szennyezett élelmiszerek és takarmányok ártalmas hatásait 4 lehetséges úton tudjuk elkerülni:

- a szennyezés megelőzése
- a mikotoxinnal szennyezett élelmiszerek és takarmányok detektálása/kimutatása
- a mikotoxint tartalmazó élelmiszerek és takarmányok fertőtlenítése
- az elfogyasztott élelmiszerben lévő toxin felszívódásának gátlása a béltraktusban

3./3.1. Szántóföldi (pre-harvest) kontroll

Az alacsonyabb pre-harvest mikotoxin szennyezettség elérése érdekében a szántóföldi növényeket hagyományosan fungicidekkel kezelik (Mesterházy és Bartók 1996). A fungicidkezeléseknek a borok OTA-tartalmára gyakorolt hatását számos laboratórium vizsgálta már. Lo Curto és mtsai. (2004) megvizsgálták néhány peszticid (Azoxystrobin, Dinocap) alkalmazását kénes kezeléssel kombinálva, és azt tapasztalták, hogy a kezelések hatására jelentősen csökkent az OTA-tartalom a borokban. Görög kutatók szintén peszticideket – pl. Carbendazim és Chorus – alkalmaztak, melyekkel nem értek el jelentős kontrollt az *Aspergillus* fajok esetében, míg a Switch peszticid alkalmazása jelentősen csökkentette az *Aspergillus*-ok előfordulását a szőlőfajokon (Tjamos és mtsai. 2004). Manapság azonban a környezet szempontjából jóval kíméletesebb alternatívák után kutatnak.

3./3.1.1. *Rezisztens növények nemesítése*

A hagyományos növénynemesítés célja, hogy javítsa a növényi gazdaszervezet ellenállóképességét a gombafertőzésekkel szemben. Ígéretesnek tűnnek pl. a *Fusarium*-fertőzéssel szemben búzán és kukoricán végzett kísérletek (Munkvold, 2003). Találtak már számos búza-, rizs- és árpavariánst melyek különböző rezisztenciával rendelkeznek a gombatámadásokkal és OTA-felhalmozódással szemben, de szelektálni lehetne a gombatámadásokkal szemben erősebb variánsokat is (Chelkowski és mtsai. 1981). Ezt a nemesítési stratégiát azonban eddig a gyakorlatban még nem sikerült alkalmazni.

A hagyományos nemesítési stratégiák mellett – szántóföldi növények esetében – a molekuláris markerekkel segített nemesítés is ígéretes. A marker-segített szelekció során a molekuláris genetikai markereket, mint indirekt szelekciós eszközöket használják a növénynemesítésben. A technika alapját a QTL (*quantitative trait loci*) adja. A QTL kromoszóma régiókat jelöl, amelyek mennyiségi jellegeket kódolnak. A mennyiségi jellegeket – pl. a búza és az árpa kalászfuzáriózissal, vagy a kukorica aflatoxin-akkumulációval szembeni rezisztenciáját – több gén határozza meg. A molekuláris markerek a QTL-hez kapcsolódnak (Buerstmayr és mtsai. 2002, 2003, Somers és mtsai. 2003, Paul és mtsai. 2003).

3./3.1.2. *Biokompetitív exklúzió*

Biokompetitív exklúzió – vagy biokompetitív kizárás – technikája (Horn és mtsai. 2001) pl. az aflatoxin-termelő *A. flavus* és *A. parasiticus* izolátumok biológiai kontrollja atoxinogén *A. flavus* izolátumok felhasználásával. A biológiai kontroll során alkalmazott atoxinogén *A. flavus* és *A. parasiticus* törzsek hatékonyan csökkentették a földimogyoró esetében az aflatoxin-szennyezettséget. A Circle One Global nevű cég (USA) kizárólagos licensszel rendelkezik a fent leírt módszer alkalmazására a földimogyoróföldeken.

Az endofita *Enterobacter cloacae* jelenléte a kukoricagyökerekben alacsonyabb fumonizin-szintet eredményezett (Cleveland és mtsai. 2003). Mandulából és pisztáciából izolált élesztők szintén ígéretes *A. flavus* elleni biokontroll ágensek (Cleveland és mtsai. 2003).

3./3.1.3. Génmanipuláció

Génmanipuláció során vagy a növényi géneket módosítják, hogy a növény kevésbé legyen fogékony a gombafertőzésekre és a mikotoxinokra; vagy detoxifikációért felelős géneket juttatnak be a növényi genomba. Erre példa a fumonizint szén-dioxiddá metabolizáló mikrobafajok azonosítása, mely megnyitotta az utat olyan génmanipulált kukorica létrehozása előtt, amely lebontja a fumonizint (Duvick, 2001). A transzgénikus kukoricanövényekben fumonizin-észteráz enzimeket expresszáltattak.

3./3.2. Mikotoxinok detektálása/kimutatása élelmiszerekben és takarmányokban

3./3.2.1. Analitikai eljárások ochratoxin A detektálására

Az ochratoxinok jelenlétének kimutatására mind biológiai, mind kémiai eljárásokat kifejlesztettek már de a kémiai eljárások az elsődleges fontosságúak. Az OTA-analízisnek alappontjai a következők: mintavétel, extrakció, tisztítás, koncentráció, elválasztás, detektálás és mennyiségi meghatározás, ezen kívül a pozitív minták megerősítése. A mintavétel nagyon fontos pont, mivel egy nem-reprezentatív minta érvénytelenítheti az analízist. A mezőgazdasági termékek szempontjából kiemelten fontos a mintavétel, mivel az OTA eloszlása nagyon gyakran inhomogén. Az ochratoxinokat közvetlenül lehet extrahálni az élelmiszerekből vagy szövetekből, ezt követi a tisztítás, mielőtt a detektálásra sor kerülne (Solfrizzo és mtsai. 1998, Valenta 1998). Az ochratoxinokat általában lesavasított szerves oldószerekkel (pl.: kloroform) extrahálják, mivel az OTA neutrális és lúgos pH-értékeken disszociálódik, vagyis nem működik az extrakció. Alacsony detektálási értékeknél szükséges lépés a tisztítási folyamat. A tisztítási lépés kivitelezhető, folyadék-folyadék elválasztással, Na-bikarbonát oldatot alkalmazva, vagy szilárd fázisú extrakcióval (Valenta 1998). Kifejlesztettek egy monoklonális antitest-alapú immunoaffinitású oszlopot is, mely helyettesítheti a hagyományos, oldószeres tisztítási lépést (Sharman és mtsai. 1992, Ueno és mtsai. 1991).

Az első, OTA-ra kifejlesztett kémiai detektálási eljárás egy spektrofluorometriás detektálás volt, melyben karboxipeptidáz A-t alkalmaztak (Hult és Gatenbeck 1976). Később jóval érzékenyebb kromatografiás metodikákat fejlesztettek ki az OTA kimutatására. Ilyen például a vékony-réteg kromatográfia (TLC) vagy a nagy teljesítményű TLC alkalmazások, melyeket még széles körben használnak a mezőgazdasági termékek OTA-szűrésére (Valenta 1998). Az árpa- és zöld kávébab-minták OTA-tartalmának analízisére kifejlesztettek egy fluorescens detektálással párosított HPLC technikát, amit már több mint 20 éve széles körben alkalmaznak (Hunt és mtsai. 1980). A kromatografiás

technikák mellett immunokémiai eljárásokat is kifejlesztettek az élelmiszer-árúciók OTA-tartalmának gyors szűrésére (Yu és mtsai. 2005, Barna-Vetró és mtsai. 1996, Zheng és mtsai. 2005). A legújabb laboratóriumi vizsgálatokban, az ELISA sikeresen alkalmazható eljárás a borok OTA-tartalmának kimutatására, és összehasonlítható a HPLC-analízis során kapott eredményekkel (Ratola és mtsai. 2006). A legtöbb esetben két független analitikai eljárást használnak a pozitív minták igazolására.

3./3.2.2. Az ochratoxin A molekuláris biológiai detektálása

Az OTA-t termelő gombák molekuláris biológiai detektálására több különböző megközelítést használtak. Schmidt és mtsai. (2004a, 2004b) fajspecifikus indítószekvenciákat (primereket) alkalmaztak az *A. ochraceus* és *A. carbonarius* AFLP-profilon alapuló detektálására, és ezen primereket alkalmazták e törzsek mennyiségi meghatározására kávébab esetében. Fungaro (2004) és Voetz (2002) tervezett primerek RAPD-technika segítségével különítették el az *A. carbonarius* valamint az OTA-termelő *Aspergillus* és *Penicillium* törzseket. A Perrone és mtsai. (2004) által kalmodulin génszekvenciára tervezett primerek a *A. carbonarius* és *A. japonicus* elkülönítését teszik lehetővé. A Haugland és mtsai (2004) által alkalmazott primerek az ITS 1 és 2 rRNS gén szekvenciáján alapulnak és számos *Aspergillus* és *Penicillium* faj, többek közt az *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius* és *P. verrucosum* elkülönítését teszik lehetővé. Hasonló primereket fejlesztettek ki Patino és mtsai (2005) is. Mule és mtsai (2006) valós idejű (real time) PCR technikát alkalmazva azonosították az *A. carbonarius*-t szőlőről a kalmodulin génre tervezett fajspecifikus primerek segítségével. Napjainkban Susca és mtsai. (2007) a kalmodulin gén egy részének szekvencia-variációján alapuló SSCP-PCR (PCR-single-stranded conformational polymorphism) módszert fejlesztettek ki. E technika segítségével 11 faj, többek közt *A. brasiliensis*, *A. foetidus*, *A. aculeatus*, *A. uvarum*, *A. japonicus*, *A. elliptikus*, *A. heteromorphus*, *A. carbonarius* és *A. ibericus* bizonyult elkülöníthetőnek eltérő PCR-SSCP profilja alapján.

O'Callaghan és mtsai. (2003) poliketid-szintázokat (PKS) azonosítottak az *A. ochraceus* fajból, melyek részt vesznek az OTA bioszintézisében. E szekvenciákhoz tervezett primerek segítségével azonosították az OTA-termelő gombákat, többek közt az *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* és *Penicillium* fajokat (Dobson és O'Callaghan, 2004). Más kutatók is fejlesztettek ki PKS-specifikus primereket OTA-termelő *Aspergillus* fajok azonosítására (Borgida és mtsai. 2003, Dao és mtsai. 2005, Tóth és mtsai. 2004). Mostanában Schmidt-Heydt és Geisen (2007) kifejlesztett egy mikrorend

(*microarray*) technikát különböző mikotoxin-termelő gombák detektálására, mely technika az aflatoxin, trichothecén, fumonizin, patulin és ochratoxin bioszintézisének útvonalában résztvevő gének szekvenciáin alapul.

3./3.3. Raktári (*post-harvest*) kontroll

A mikotoxin-tartalmú mezőgazdasági termények dekontaminációja „fertőtlenítése” történhet fizikai, fizikokémiai, kémiai és (mikro)biológiai eszközökkel. A detoxifikációs műveletekkel szemben támasztott követelmények a következők:

- ne csökkenjen az élelmiszer tápértéke és fogyaszthatósága
- ne változzanak meg a termék technológiai - a további feldolgozás szempontjából szükséges - tulajdonságai
- az eljárás műszakilag és gazdaságilag nagyüzemi szinten is kivitelezhető legyen
- a keletkező bomlástermék(ek) ne legyenek toxikusak
- a gombaspórák és micéliumok eliminálása, hogy újabb toxin ne termelődjön
- gazdaságilag teljesíthető legyen (a fertőtlenített élelmiszernek az ára alacsony legyen)

3./3.3.1. Fizikai módszerek

Mechanikai szeparáció, sűrűség szerinti különválasztás, szín szerinti osztályozás révén a gabonaszemek mikotoxin-tartalma jelentősen csökkenthető. Egyszerű átmosási eljárások (vízzel vagy Na-karbonát oldattal) csökkentik a deoxinivalenol, zearalenon és fumonizin koncentrációját gabonában. Ezen kívül alkalmaznak még hőkezelést (fumonizin B1) 150-200 °C-on és mikrohullámú kezelést (trichothecének). Gamma-sugárzással sikeresen kontrollálták a takarmány ochratoxin-szintjét (Refai és mtsai. 1996).

3./3.3.2. Fizikokémiai módszerek

Másik módszer a mikotoxinok detoxifikálására az adszorbensek alkalmazása: a mikotoxin-kötő adszorbensek használata a leginkább alkalmazott fizikokémiai módszer, hogy megvédjék az állatokat a mikotoxinnal szennyezett takarmány ártalmas hatásaival szemben. A takarmányhoz adott adszorbensek képesek szorosan kötni, immobilizálni a toxinokat, ezáltal csökkentik azok felszívódását az állatok gasztrointesztinális traktusában. Az adszorpció hatékonysága függ az adszorbens és a mikotoxin kémiai szerkezetétől. Mielőtt azonban ezt a módszert a gyakorlatban is alkalmaznák, meg kell vizsgálni, hogy az

adszorbens nem gátolja-e létfontosságú tápanyagok felszívódását a táplálékból. Néhány példa az alkalmazott adszorbensekre:

- Hidratált nátrium-kalcium-aluminoszilikát (HSCAS): legjobban az aflatoxin B1 ellen, kismértékben a zearalenon és az OTA ellen hatékony.
- Aktív szén (AC): hatékony az aflatoxin B1 és a T-2 toxin ellen, ezen kívül képes adszorbeálni a fumonizin B1-et és az OTA-t vizes oldatban, de *in vivo* nem működik (Solfrizzo és mtsai. 2001, Rotter és mtsai. 1989).
- Kolesztiramin (CH): hatékony a zearalenon, a fumonizin B1 és az OTA ellen (Ramos és mtsai. 1996, Kerkadi és mtsai. 1998).
- Bentonit: hatékony a T-2 toxinnal szemben, az aflatoxin elleni hatékonysága kérdéses (Ramos és mtsai. 1996).
- Divinilbenzén-sztirén polimerek: T-2 toxinnal szemben hatékony.
- Polivinilpirrolidon (0,2%): deoxinivalenollal (DON) szemben hatékony.

3./3.3.3. Kémiai módszerek

Számos vegyületet – pl. kalcium-hidroxid-monometilamin, nátrium-biszulfít, ózon, klórgáz, hidrogénperoxid, aszkorbinsav, hidroklorosav, kén-dioxid, formaldehid, ammónia és ammónium-hidroxid – hatásosnak találtak több mikotoxinnal szemben, mint pl. a deoxinivalenol, zearalenon, T-2 toxin, aflatoxin és a fumonizin. Aflatoxin-szennyezett takarmány detoxifikálására a legelfogadottabb módszer az ammonizálás, amit az USA-ban, Franciaországban, Nagy-Britanniában és Afrikában sikeresen alkalmaznak is. Az ammonizálás azonban nem hatásos a fumonizinnal szemben. A nátrium-biszulfít a leghatékonyabb a deoxinivalenol ellen, bár a kezelés miatt a gabona nem alkalmas közvetlen emberi fogyasztásra. Az Európai Közösségben nem engedélyezik a kémiai kezelést olyan árucikkek esetében, melyeket emberi fogyasztásra szánnak. A vegyszerek a következő csoportokba sorolhatók: savak, bázisok (ammónia, nátrium-hidroxid), oxidáló reagensek (hidrogénperoxid, ózon), redukáló ágensek (biszulfid, cukrok), klórozó ágensek (klór), sók és kevert reagensek (formaldehid). A kémiai módszereket gyakran kombinálják a fizikai módszerekkel, hogy tovább emeljék a dekontamináció hatékonyságát.

3./3.3.3.1. Kémiai módszerek az ochratoxin A detoxifikálására:

A formil-, propion- és szorbinsav degradálja az OTA-t 0,25-1%-os koncentráció esetén 3-24 óra alatt. Az ammonizálás majdnem teljesen lebontja az OTA-t kukoricában, búzában

és árpában. A hőkezelés 0,5% nátrium-hidroxiddal vagy az autoklávozás szintén hatásos (Scott, 1996). Na-hipokloritos kezelés során is megfigyelték az OTA lebomlását.

3./3.3.4. Biológiai módszerek

A biológiai detoxifikáció definiálható úgy, mint a mikotoxinok enzimatisz degradációja vagy biotranszformációja, amit egy sejt, vagy egy enzimrendszer segítségével érnek el. Másik szemlélet szerint a biológiai módszerek közé sorolható még a biokompetitív ágensek és a genetikailag módosított növények alkalmazása is.

3./3.3.4.1. Biológiai módszerek az ochratoxin A detoxifikálására

Számos tanulmány foglalkozott már az OTA biológiai lebontásával (detoxifikálásával). Széles körben vizsgáltak mikroorganizmusokat, hogy képesek-e lebontani az OTA-t, vagy átalakítani ochratoxin α -vá (nem toxikus), vagy más kevésbé toxikus vegyületekké. A mikrobákat és az enzimeket a 4. táblázat foglalja össze.

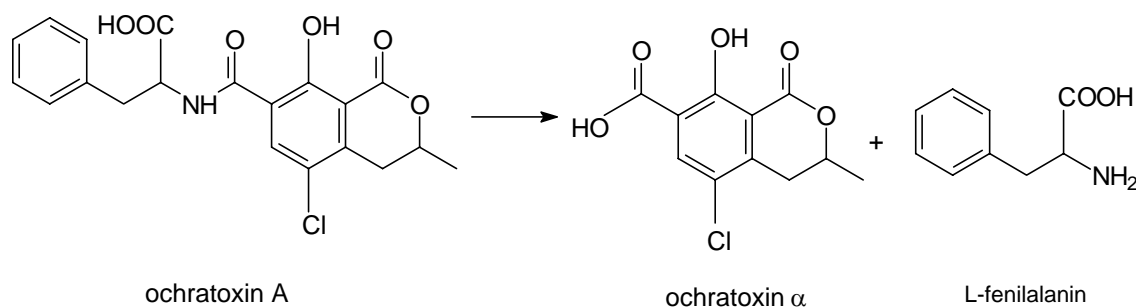
A szarvasmarha és a juh gasztrointesztinális traktusában, elsősorban a bendőben élő mikroorganizmusok enzimeik segítségével szintén képesek bontani az OTA-t, ilyen mikroba pl. a *Butyrivibrio fibrisolvens* (Westlake és mtsai. 1987; Galtier és Alvinerie 1976; Hult és mtsai. 1976; Xiao és mtsai. 1991). A humán bélmikroflóra is képes kis mértékben az OTA degradációjára (Akiyama, 1997). Más baktériumok között is vannak, amelyek képesek a toxikus OTA-t ochratoxin α -vá alakítani folyadékkultúrában, ilyenek a *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Phenyllobacterium immobile*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* (Skrinjar és mtsai, 1996). *Bacillus pumilus* esetében olyan antifungális metabolitokat izoláltak, melyek akadályozzák az OTA-termelést (Munimbazi és Bullerman 1998). Számos gerinctelen állatra is toxikus hatással van az OTA például a *Helicoverpa zea*-re (Kukorica bagolylepke), és a *Carpophilus hemipterus*-ra (Aszalvány bogár), de bizonyos élőlényekre, például az *Anagasta kuehniella*-ra (Lisztmoly) nincs hatással, így ezek a rezisztens állatok esetleges forrásai lehetnek az OTA-detoxifikáló enzimeknek (Wright és Harein 1982, Karlovsky, 1999). Kukorica-, paradicsom- és búza-sejtkultúrák vizsgálata során kiderült, hogy az OTA átalakul más összetevőkké. Az OTA toxicitásának csökkenéséért a transzformációs reakciók lehetnek felelősek, pl. az észter- és peptidkötés hidrolízise, a metiláció, illetve a hidroxiláció (Ruhland és mtsai. 1994).

Élesztő sejtfal-preparátumait és más élesztőfajokat szintén felhasználnak OTA-adszorpcióhoz (Hua 2003, La Penna és mtsai. 2004, Petersson és Schnurer 1995). Bejaoui és mtsai. (2004) sikeresen alkalmaztak inaktivált *Saccharomyces* fajokat OTA-tartalmú szőlőlevelek dekontaminálására.

A mikroorganizmusok szűrése (*screen*) során számos mikrobáról kiderült, hogy képes átalakítani az OTA-t egy kevésbé toxikus vegyületté. Erre a detoxifikációra számos példa sorolható fel, így például az *A. niger* az OTA-t ochratoxin α -vá alakítja, melyet tovább bont egy ismeretlen anyaggá. A reakcióút, amely az izokumarin gyűrű felnyílásához vezet, mindeddig ismeretlen (Varga és mtsai. 2000). Ezen atoxinogén *A. niger* törzs OTA-bontási kinetikájának vizsgálata során kiderült, hogy a CBS 120.49 jelű *A. niger* törzs hatékonyan eliminálja az OTA-t szilárd és folyékony közegből egyaránt. Az *A. niger* karboxipeptidáz A és lipáz enzimeit alakítja át az OTA-t ochratoxin α -vá és fenilalaninná (Deberghes és mtsai. 1995, Stander és mtsai. 2001) (4. ábra). Az *A. fumigatus* és *A. japonicus* fajokról isleírták, hogy képesek bontani az OTA-t (Varga és mtsai, 2000).

Abrunhosa és mtsai (2002) fekete *Aspergillus* és egyéb *Aspergillus* fajokat, ezen kívül más gomba izolátumokat tesztelték OTA-bontó képességre. A tesztelt fajok 67%-a (51 izolátum) képes volt degradálni a toxin több mint 80%-át YES-Difco (élesztő-szacharóz) táptalajon. *Penicillium* és *Cladosporium* fajok a kezdeti toxinmennyiség 80%-át eliminálták, az *Alternaria sp.*, *Botrytis cinerea* és *Emericella nidulans* a kezdeti toxin mennyiség több mint 50%-át degradálták. Harmincöt fekete *Aspergillus* törzs (a tesztelt izolátumok 95%-a) képes volt elbontani a kezdeti toxin mennyiség 80%-át. Az OTA-lebontás termékei megegyeztek az összes tesztelt fekete *Aspergillus* fajnál, ezen összetevők retenciós ideje közel volt az ochratoxin α -éhoz. Az egyéb tesztelt *Aspergillus* izolátumok közül két ochratoxin-termelő faj (*A. alliaceus*, *A. ochraceus*) nagy mennyiségben termelt ochratoxint, következésképpen az OTA szintje hat napos inkubáció után meghaladta a kezdeti hozzáadott mennyiséget. Az atoxinogén *A. ochraceus* és *A. wentii* nagymértékben bontotta az ochratoxint, viszont itt olyan degradációs termékek jelentek meg, amiket a fekete *Aspergillus* fajoknál nem tapasztaltak. A pozitív eredmények alapján néhány fajból megpróbálták kitisztítani a hidrolízisért felelős enzimet, amely feltehetőleg egy metalloenzim, mely a karboxipeptidáz A-hoz hasonlóan hat (Abrunhosa és mtsai. 2006; Abrunhosa és Venancio 2007).

Enzimek alkalmazása lenne a legmegfelelőbb az OTA lebontására: különböző degradációs enzimek génjeit be lehetne juttatni atoxinogén izolátumokba. Számos hidrolázt teszteltek OTA-bontó képességre nézve. Az emlős karboxipeptidáz A képes elhasítani az ochratoxint. A lipázról közismert, hogy hasítja az amino-kötéseket, ebből adódóan felhasználják peptidek bontására kereskedelmi eljárásokban (Stander és mtsi. 2000). Huszonhárom kereskedelmi hidrolázt teszteltek: lipázokat és észterázokat vizsgáltak OTA-hidrolizáló képességre nézve. Minőségi elemzést végeztek vékonyréteg kromatográfiával (TLC), melyből kiderült hogy csak egy *A. niger*-ből preparált lipáz volt képes degradálni az OTA-t. Ezt HPLC-analízissel is megerősítették. Nagyon valószínű, hogy proteázok vagy amidázok voltak felelősek a hidrolitikus aktivitásért. Tisztított enzimet szintén használtak OTA-degradációra, ami átalakítható olyan lipázzá, amelynek szubsztrátja a *p*-nitrofenil palmitin. Az eredmények alapján az *A. niger* lipáza az OTA-t fenilalaninná és ochratoxin α -vá degradálja (Stander és mtsi. 2000).



4. ábra A karboxipeptidáz A enzim ochratoxin A-bontása.

4. táblázat Ochratoxin-bontó mikroorganizmusok és enzimek.

Mikroorganizmusok / enzimek	Referencia
Baktériumok	
Rumen mikrobák	Galtier és Alvinerie, 1976; Hult és mtsai. 1976; Akiyama, 1997
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Westlake és mtsai. 1987
<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp.	Skrinjar és mtsai. 1996
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>	Böhm és mtsai. 2000
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Hwang és Draughon, 1994
<i>Phenyllobacterium immobile</i>	Wegst és Lingens, 1983
<i>Nocardia corynebacterioides</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp.	Holzappel és mtsai. 2002
<i>Lactobacillus</i> sp.	Piotrowska és Zakowska, 2000
<i>Eubacterium callenderi</i> , <i>E. ramulus</i> , <i>Streptococcus pleomorphus</i> , <i>Lactobacillus vitulinus</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>S. saccharolytica</i> , <i>Stenotrophomonas nitritreducens</i> , <i>Ralstonia eutropha</i> , <i>R. basilensis</i> , <i>Ochrobactrum</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp.	Schatzmayr és mtsi. 2004, 2006
Talajbaktériumok	Mortensen és mtsai. 2006
Protozoák	Oznipar és mtsai. 2002
Gombák	
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigatus</i>	Varga és mtsai. 2000
<i>A. niger</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. wentii</i> , <i>A. ochraceus</i>	Abrunhosa és mtsai. 2002
<i>A. niger</i> , <i>A. japonicus</i>	Bejaoui és mtsai. 2006
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Engelhardt, 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Piotrowska és Zakowska, 2000
<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i>	Bejaoui és mtsai. 2004
<i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>R. microsporus</i> , <i>R. homothallicus</i> , <i>R. oryzae</i>	Varga és mtsai. 2005
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	Molnar és mtsai. 2004, Politis és mtsai. 2005
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Peteri és mtsai. 2007
<i>Kloeckera apiculata</i>	Angioni és mtsai. 2007
Enzimek	
<i>A. niger</i> lipáz	Stander és mtsai. 2000
karboxipeptidáz A	Pitout 1969; Deberghes és mtsai. 1995; Stander és mtsai. 2001
Kereskedelmi proteázok	Abrunhosa és mtsai. 2006
Kereskedelmi hidrolázok	Stander és mtsai. 2000
<i>A. niger</i> enzim	Abrunhosa és Venancio 2007

3./4. A *RHIZOPUS* NEMZETSÉG JELLEMZÉSE

A *Rhizopus* nemzetség korábban a *Mucoraceae* családkhoz tartozott, jelenleg viszont az *Absidiaceae* családba sorolják, mely az egyik legnagyobb a *Mucorales* rendben. Morfológiai alapon Schipper (1984) 3 fajcsoportot (*Rh. stolonifer*-csoport, *Rh. oryzae*-csoport, *Rh. microsporus*-csoport) különböztet meg a nemzetségen belül, és mindössze öt fajba vonja össze az addig áttekinthetetlenül nagyszámú fajleírás alapján létrehozott fajokat. Későbbi DNS-renaturációs kinetikai vizsgálatok lényegében igazolták ezt a felosztást (Ellis, 1985; 1986). Mostanában az izoenzim-analízist és a RAPD-módszert alkalmazzák a *Rhizopus* fajok taxonómiai tanulmányozásához. Az izoenzim-analízist az intra- és inter-specifikus eltérések leírására használják a taxonómiai vizsgálatok során (Liou és mtsai. 2001). A RAPD-analízis feltárja a genetikai változékonyságot *Rh. stolonifer* fajokon belül (Vágvölgyi és mtsai. 2004), bár *Rhizopus*-csoportok közötti filogenetikai kapcsolatok és a *Rh. stolonifer*-csoport meghatározásának kritériumai még nem tisztázottak (Liou és mtsai. 2007). Ma már a molekuláris genetikai megközelítések általánosan használatosak a fonalgombák esetében is, és alapvetőek a modern taxonómiában (Binder és Hibbett, 2002; O'Donnell és mtsai. 2001; Voigt és mtsai. 1999).

A nemzetségbe tartozó gombák jellegzetes morfológiai képletei a rizoidok és sztolonok, ezek megléte különbözteti meg őket a *Mucor* nemzetségtől. A sztolonok indaszerű léghifák, melyek ha érintkeznek a szubsztráttal sporangiumtartókat és azok eredésénél rizoidokat ("gyökérszerű léghifákat") fejlesztenek. Nem elágazó sporangiumtartóik egyértelműen megkülönböztetik ezeket a fajokat a *Thermomucor* és *Rhizomucor* nemzetségek tagjaitól (ezek elágazó sporangiofórokkal rendelkeznek). A sporangiumtartók magányosan vagy csoportosan fordulnak elő, sok spórás, terminális sporangiumokat hoznak létre. A sporangiumok gömbszerűek, éretten szürkés-barnás színűek. Sporangiospóráik ellipszoid alakúak, szögletesek, soha nem gömbszerűek. A zigospórák szemölcsökkel vagy barázdákkal díszítettek. A micéliumon az oldalirányban növekedő zigofór kémiai indukció hatására találja meg a vele kompatibilis hifanyúlványt. A két gametangium közt a fúziós szeptum feloldásával lejátszódik a plazmogámia, amelyet a kariogámia követ. Az így kialakult zigosporangiumban jön létre a zigospóra.

A *Rhizopus* nemzetség képviselői könnyen izolálhatók a természetből. Előfordulnak a talajban, gyümölcsökön, különböző élelmiszereken, mindenféle bomló anyagon, és gyakran okoznak laboratóriumi kontaminációt is. Növénykárosítóként az *Rh. stolonifer* szerepét tartják legmeghatározóbbnak. Az általa okozott lágyrothadást könnyű

összetéveszteni a *Mucor* fajok (különösen az *M. piriformis*) által kiváltott tünetekkel (Smith és mtsai. 1979; Michailides, 1991). Az *Rh. stolonifer* is képes egészséges gyümölcsöt fertőzni és gyümölcsrothadást kiváltani (Wilson és Ogawa, 1979). A *Rhizopus* fertőzések főleg a következő növényeket károsítják: ananász, avokádó, barack, burgonya, citrusfélék, cseresznye, földieper, körte, paradicsom, lucerna, egyes keresztesvirágúak, szeder-, szőlő- és tökfélék. Ezekből a fertőzések közül főleg az *Rh. stolonifer* tenyésztethető ki, de a *Rh. oryzae* és a *Rh. microsporus* csoport tagjai is előfordulhatnak.

A *Rhizopus* nemzetségbe tartozó gombákat nemcsak növénykárosító és raktári kártevő szervezetekként, hanem fakultatív humánpatogén kórokozókként is nyilvántartják. Az általában súlyos kimenetelű, elsősorban károsodott, vagy legyengített immunrendszerű betegeket érintő zigomikózisok leggyakoribb kórokozóiként tartják őket számon. Közülük is a *Rh. oryzae* váltja ki a legtöbb fertőzést (Scholer és mtsai. 1983; Ribes, 2000; Whiteway és mtsai. 1979).

Rhizopusok előfordulnak különböző távolkeleti fermentált ételekben, mint pl. a tempeh, ragi, koji. Különösen a *Rh. oryzae* és *Rh. microsporus* csoport képviselőit használják ilyen célokra. Ezzel kapcsolatban vizsgálták mikotoxintermelésüket is. Jelenleg az egyetlen ismert és jellemzett *Rhizopus* toxin a rhizonin A, amelyet egyes *Rh. microsporus* törzsek termelnek (Steyn és mtsai. 1983). Toxicitást más törzsek esetében is detektáltak, de a feltételezett mikotoxinokat nem azonosították (Rabie és mtsai. 1985).

3./5. PHAFFIA RHODOZYMA JELLEMZÉSE

Az 1960-as években Herman Jan Phaff izolálta először a *Phaffia rhodozyma*-t karotinoidtermelő narancsvörös sarjadzó élesztőként (Phaff és mtsai. 1972). Először Japánban és Észak-Amerika északnyugati partvidékén különböző lombhullató fák nedveiből izolálták, később azonban további törzseket izoláltak Oroszországban, Finnországban, Chilében és az Egyesült Államok más régióiban is. Az élesztőgombát először a *Rhodozyma montanae*-ként nevezték el, majd később felfedezőjéről a nemzetség a *Phaffia* (Miller és mtsai. 1976), az egyetlen ide tartozó faj pedig a *Phaffia rhodozyma* nevet kapta. Az általa termelt karotinoidok közül az asztaxantin bizonyult a fő komponensnek, a festékanyag mintegy 85%-át kiteve, ezen felül más forrásokból származó asztaxantinokkal szemben ezen élesztő által termelt asztaxantin 3R,3'R konfigurációjú. Andrewes és munkatársai (1976) egy lehetséges bioszintetikus útvonalat javasoltak az asztaxantin-képződésére *Ph. rhodozyma*-ban.

Az izolátumok színének intenzitása törzsenként változó, de függ a tenyészet korától is (Miller és mtsai. 1976, Johnson, 2003). Ezen élesztő számos cukrot képes fermentálni (glükózt, szacharózt, raffinózt és maltózt), ellentétben a *Rhodotorula rubra*-val és a többi hasonló karotinoid-termelővel. Szokatlanul alacsony a fehérje-, viszont magas a lipid- és szénhidráttartalma.

A morfológia, a többrétegű sejtfal, a *Heterobasidiomyces* élesztőkkel mutatott hasonlóság, az enteroblasztikus sarjképződés, a metabolikus tulajdonságok és a pigmentáció alapján feltételezték, hogy ez egy *Basidiomycota* csoportba tartozó gomba, bár Miller és mtsai (1976) nem vizsgálták a faj szexuális életciklusát. Ezért a *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*) csoportba tartozó fermentáló élesztőként sorolták be. Golubev (1995) ezt követően meghatározta a szexuális ciklusát, beleértve a homothallikus mating-et az anyasejt és a sarja között, és végül bizonyos fajokban hosszú holobazídiumokat és terminális bazidiospórákat figyelt meg. A teleomorf alakot *Xanthophyllomyces dendrorhous* néven, új fajként írták le, és a *Ph. rhodozyma* CBS 5905 törzset a *X. dendrorhous* anamorf alakjának vélték. Az anamorf élesztő típustörzsének a *Ph. rhodozyma* UCD 67-210-et jelölték ki, melyet később, mint teleomorf fajt helyeztek törzsgyűjteménybe CBS 5905 (ATCC 24202) (*Xanthophyllomyces dendrorhous*).

Az 1990-es években a *Phaffia/Xanthophyllomyces* izolátumok további biokémiai, filogenetikai és taxonómiai jellemzéséhez különböző molekuláris megközelítéseket alkalmaztak. Az elektroforetikus kariotipizálás eredményeit megvizsgálták egy contour-

clamped homogén elektromos mezővel (Nagy és mtsai. 1994; Adrio és mtsai. 1995) és OFAGE (*orthogonal field alternation gel electrophoresis*) módszerrel (Nagy és mtsai. 1995a, 1995b) ezzel felfedve a lényeges kromoszómahossz-polimorfizmusok meglétét törzsek között. A haploid sejtek pontos kromoszómaszám meghatározása nehéz a kromoszómális DNS ko-migrációja miatt, mindazonáltal optimalizált szeparációs körülmények között jobb eredmény érhető el, és jóval pontosabban meghatározható a kromoszómaszám (Palágyi és mtsai. 1996; 1999). Egy más megközelítés, a radioaktívan jelölt kromoszóma-átrendeződés, szintén alkalmazható, hogy pontos adatot szerezzünk a genom méretéről (Nagy és mtsai. 1996; 1997). Ezen a kísérletek alapján a törzsek becsült teljes genommérete 15,4 és 23,2 Mbp között változik. Néhány faj, melyeket előzőleg azonos eredetűnek tekintettek, eltéréseket mutatott az elektroforetikus kariotípusában, és a *Phaffia rhodozyma* típus törzse (CBS 5905) esetében lényeges különbséget mutattak ki a kromoszómaszám és genomméret tekintetében.

Varga és munkatársai (1995a; 1995b) izoenzim analízissel különböző *Ph. rhodozyma* törzseket hasonlítottak össze, és azt a következtetést vonták le, hogy az izoenzim-markerek jóval használhatóbbak, mint a RAPD- vagy a riboszómális DNS-analízis. A vad típusú izolátumok szénforrás-asszimilációs mintázatát vizsgálták Palágyi és munkatársai (1998; 2001). Strukturális és filogenetikai analízisekben a *Ph. rhodozyma* aktin génje (Wery és mtsai. 1996), a *Ph. rhodozyma* intronok szerkezete igazoltan hasonló a bazídiumos *Filobasidiella neoformans* (perfekt alakja *Cryptococcus neoformans*) génjével és intronjaival. A *Ph. rhodozyma* intronok kivágódása más, mint az aszkuszos *Saccharomyces cerevisiae* esetében.

Castillo és Cifuentes (1994) dupla-szálú RNS-t (dsRNS) és vírus-szerű partikulumokat detektáltak bizonyos *Ph. rhodozyma* izolátumokban, míg Pfeiffer és munkatársai (1996) eltéréseket találtak *Phaffia* fajok között, ez egyaránt vonatkozott a gazdasejtben lévő dsRNS-ek számára és hosszúságára. Szintén megvizsgálták a VLP-k basidiospórákon keresztül történő átadását a szexuális ciklus alatt.

Más molekuláris technikák ugyancsak sikeresen használhatóak a *Ph. rhodozyma* fajok jellemzésére. Palágyi és munkatársai (2004) elvégezték egy RAPD-analízist 13 *Phaffia*/*Xanthophyllomyces* élesztőtörzzsel, ezután a RAPD-adatokat felhasználták klaszteranalízisre. Ezzel demonstrálták az összefüggést a korábbi tanulmányok eredményeivel: a klaszterek egyike tartalmazta azokat az izolátumokat (beleértve a CBS 5905 jelű típustörzset), melyek nem tudnak spórázni, de képesek légzésben hibás petite mutánsokat produkálni (Kucsera és mtsai. 1998). Ezeknek az izolátumoknak a genom

mérete több mint 20 Mbp (Nagy és mtsai. 1994). A másik klaszter a spórázni képes, petite negatív *Xanthophyllomyces* törzseket tartalmazta, melyek genom mérete körülbelül 16 Mbp.

Felhasználása a takarmányozásban:

A *Ph. rhodozyma* vizsgálata az 1990-es években került előtérbe, mint lehetséges ideális takarmány-kiegészítő és természetes asztaxantin forrás, mint hús- és tojásszínjavító, illetve gyökfogó. Alkalmazási területe elsősorban pisztrángokra és egzotikus madarakra terjedt ki, mivel ezek nem képesek pigmentanyagok szintézisére és szervezetükben az élesztő-asztaxantin könnyen abszorbeálódott. A vad törzs hozzávetőleg 100-200 ppm / szárazanyag mennyiségű pigmentet tartalmaz 6 nap tenyésztés után, ezért nagy mennyiségben kellett alkalmazni, mely nem volt gazdaságos. Elkezdődtek a biomassa és a pigmentmennyiség növelését célzó kutatások és optimalizálási kísérletek. Az elmúlt évek során nagy mennyiségű adat halmozódott fel a szaporítás optimalizálásával, a lehetséges szénforrások alkalmazásával, a mutációs nemesítési lehetőségével kapcsolatban és fokozottan asztaxantin-termelő *Phaffia* törzseket hoztak létre.

3./6. AZ ASPERGILLUS NEMZETSÉG JELLEMZÉSE

Az *Aspergillus* nemzetség teleomorf, szexuálisan szaporodó alakjai az aszkuszos gombák *Eurotiales* rendjének *Trichocomaceae* családjába tartoznak (Webster, 1986; Alexopoulos és mtsai, 1996). A nemzetség anamorf alakjait a gombák *Deuteromycetes* (Fungi Imperfecti) osztályába sorolják. Az *Aspergillus* nemzetség az eukarióta fonalas mikroszervezetek egyik legintenzívebben vizsgált csoportja. A nemzetség tagjai jelentőségüket több tényezőnek is köszönhetik. Egyrészt ipari termelésben hasznosak, többféle metabolit gazdaságos előállítására alkalmazhatók. Számos fajukat alkalmazzák különböző enzimek (pl. amiláz, pektinázok, proteázok, glükóz-oxidáz), szerves savak (pl. citromsav, glukonsav) termeltetésére, távol-keleti étel fermentációkban, illetve gyógyászatban alkalmazott vegyületek, pl. antibiotikumok, vagy a lovasztatin előállítására. *Aspergillus* fajokat alkalmaznak szteroidok biokonverziójára, illetve pl. inzulin, kimozin heterológ expressziójára is (van Gorcom és mtsai, 1994). Számos faj szkleróciumai rovarellenes vegyületek forrásai (Wicklow és mtsai, 1994). Az *Aspergillus* nemzetség gazdasági szempontból legjelentősebb csoportját a fekete *Aspergillus* fajok képezik, melyeket pl. citromsav, amiláz, pektináz, proteáz, glükóz-oxidáz előállítására alkalmaznak a fermentációs iparban. Közülük az *A. niger* rendelkezik az *US Food and Drug Administration* által adható GRAS („generally regarded as safe”) minősítéssel, azaz e faj alkalmazásával létrehozott termékek (enzimek, szerves savak) felhasználhatóak ételadalékként (Roehr, 1992; Berka és mtsai, 1992). Az *Aspergillus* fajok közül még az *A. oryzae* és *A. sojae* rendelkeznek ilyen „bizonyítvánnyal”.

Az *Aspergillus* fajok által okozott kártétel is jelentős. Számos *Aspergillus* faj alacsony vízaktivitás-érték mellett is képes szaporodni (pl. *A. chevalieri*, *A. amstelodami*, *A. restrictus*), ezért e fajok a tárolt gabonafélék raktári kártevőiként súlyos gazdasági károkat okoznak. Néhány *Aspergillus* faj (*A. flavus*, *A. parasiticus*) a gyapot, kukorica és földimogyoró elsődleges szántóföldi kórokozója a szubtrópusi régiókban (Cotty és mtsai, 1994). Vizsgálataink alanyai, mint gyengültségi paraziták jelentősek, mandulafák koronarthadását, hagyma feketepeneszes rothadását, alma lágyrothadását idézik elő. A dohányfermentáció során is tetemes károkat okozhatnak.

Az *Aspergillus* fajok humán opportunistá kórokozóként is jelentősek, az aspergillózis különböző formáinak előidézői (pl. a tüdőmikózist az *A. fumigatus* faj idézi elő). Fekete *Aspergillus* fajok is előidézhetnek mikózisokat, sőt akár tüdőmikózis kialakításában is részt vehetnek. Extrém foglalkozási betegségként jegyezték fel a fűszerpaprika kézi

feldolgozása időszakában a paprika hasítását végző asszonyok kezén kialakuló körömágy mikózist, amit a szárítás során elszaporodó, elsősorban *A. niger* okozott. Egyes biotópokon nagy tömegben elszaporodva, lokálisan nagymennyiségű *Aspergillus* spóra (konídium) levegőbe kerülésével igen erős allergén lehet, sokszor faji hovatartozástól függetlenül is. Bizonyos *Aspergillus* fajokat (*A. flavus*, *A. terreus*, *A. tamarii*, *A. fumigatus* és *A. niger*) fontos szemfertőzést okozó patogénként tartanak számon, melyek elsősorban keratitiszt okoznak (Chowdhary és mtsai, 2005; Kredics és mtsai, 2007; Thomas, 2003; Saha és mtsai, 2006).

Néhány faj az emberre és állatokra veszélyes mikotoxinokat termel, melyek szintén súlyos gazdasági károkat okoznak világszerte. Elsősorban a gabonafélék fertőzöttsége okozhat problémát. Az import növényi termékek között a földimogyoró és a kávé komoly szennyezésével kell számolnunk, de az utóbbi idők „paprikabotrányaiért” is e toxinok a felelősek. A gazdasági szempontból legfontosabb mikotoxinok közé tartoznak pl. az *A. flavus*, *A. parasiticus* és *A. nomius* fajok által termelt karcinogén hatású aflatoxinok, illetve az *A. ochraceus* és számos más faj, így a fekete *Aspergillus* fajok (pl. *A. carbonarius*, *A. niger*) által is termelt nefropatikus ochratoxinok (Abarca és mtsai, 1994; Téren és mtsai, 1996).

Az *Aspergillus* nemzetség elméleti, biológiai jelentőségét az adja, hogy a nemzetségen belül egyaránt találkozhatunk olyan szekciókkal, amelyekbe teljes életciklusú szervezetek tartoznak (*Nidulantes* szekció) olyanokkal is, ahová csak imperfekt fajok sorolhatók (*Nigri* szekció), és vannak, amelyekbe imperfektek mellett perfekt fajok is találhatók (*Fumigati* szekció). A nemzetség biológiai szempontból legjobban ismert faja az *A. nidulans* (teleomorfja *Emericella nidulantes*), amelyet a fonalas aszkuszos gombák között a *Neurospora crassa*-val, valamint a *Saccharomyces cerevisiae* és *Schizosaccharomyces pombe* élesztőgombákkal együtt a legrészletesebben tanulmányozott eukarióta modellszervezetként tartanak számon (Smith és mtsai, 1977).

A taxonómusok a nemzetség tagjait úgynevezett fajcsoportos rendszerbe sorolták. Az egyes fajcsoportokat a csoportok legismertebb fajáról nevezték el: *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* fajcsoport stb. (Raper és Fennell, 1965). A nemzetközi botanikai kód szabályai szerint újabban a szekció elnevezést használják (Gams és mtsai, 1985), pl. *Nigri* szekció, *Fumigati* szekció.

3./7. KARBOXIPEPTIDÁZ ENZIMEK JELLEMZÉSE

A pankreász által termelt emésztőenzimek két nagy csoportba sorolhatók: endopeptidázok és exopeptidázok. Az endopeptidázok közé tartozik a tripszin, kimotripszin és az elasztáz. Ezek az enzimek együtt szekretálódnak bizonyos exopeptidázokkal: a karboxipeptidáz A-val és B-vel. A karboxipeptidáz A (CPA) és a karboxipeptidáz B (CPB) fejezi be az endopeptidázok által elkezdett munkát: hidrolizálják az oligopeptideket a polipeptidlánc C terminális vége felől. A CPA az aromás, a CPB a bázikus maradékokat preferálja – emlékeztetve a tripszin-kimotripszin komplementaritásra.

Ezek az enzimek inaktív prekursorokként szintetizálódnak, és csak közvetlenül a felhasználás előtt alakítódnak át aktív enzimmé. A CPA esetében a teljes prekursor 3 alegységből áll, amely a tripszin hasítása révén aktiválódik.

A CPA a polipeptidláncban a terminális karboxil-csoporthoz legközelebb hidrolizálja a peptidkötést. A reakció akkor megy végbe legkönnyebben, ha a karboxil-terminális vég hidrofób jellegű: egy terjedelmes alifás vagy egy aromás oldalláncot tartalmaz. A peptidkötés is sztereospecifikus, mivel a terminális karboxil-csoport L-konfigurációjú kell, hogy legyen. A második peptidkötés integritása szintén szükséges a gyors hidrolízishez. A hidrolízis lassú azon dipeptidek esetében, melyek szabad amino-csoporttal rendelkeznek. Ha viszont az amino-csoport N-aciláció révén blokkolt, gyors a hidrolízis. A CPA észteráz aktivitással is rendelkezik. A peptidhidrolízishez hasonlóan az L-konfiguráció és az aromás oldalláncot tartalmazó C-terminális vég a gyors észterhidrolízishez is szükséges.

A CPA egy cink-metalloenzim, mely nagy konformációs változáson megy át, amikor a szubsztrátot megköti. Ez azt a célt szolgálja, hogy a komponenseket együtt az aktív centrumba vigye - a cinkion három enzimátikus csoportot (His-156, Glu-72 és His-69) és vizet köt.

Számos nem-emésztő cink-karboxipeptidáz részt vesz hormonális és neuropeptid folyamatokban, bioaktív peptidek aktivációjában illetve inaktivációjában, vagy szabályozó fehérjék funkcionális módosításában, melyek szintén érdeklődés tárgyát képezik az irodalomban.

Az emlősök gasztrointesztinális traktusában lévő mikrobióta - beleértve a szarvasmarhák és a birkák bendőjében élő mikroorganizmusokat is - képes degradálni az OTA-t ochratoxin α -vá. Bár az átalakításért felelős mikrobát még nem azonosították, azt tudják, hogy a konverziót a karboxipeptidáz A hajtja végre. A pankreász által termelt CPA szintén a bélbe ürül. A szarvasmarha pankreász által termelt CPA-t izolálták és

jellemezték, génszekvenciája ismert. A humán prokarboxipeptidáz A2-t *Pichia pastoris*-ban expresszáltatták, és részletesen jellemezték az aktivációs útját (Reverter és mtsai. 1998).

Nagyon kevés információ van a karboxipeptidázok típusairól és törzsfájáról eltérő fajokban. A mai napig a legtöbb tanulmány gombák esetében a szerin-karboxipeptidázokra és egyéb enzimekre fókuszál, pl.: *Aspergillus spp.* (Dal Degan és mtsai. 1992), *Penicillium sp.* (Breddam és mtsai. 1986), *Mucor racemosus* (DiSanto és mtsai. 1992) és élesztők esetében (Endrizzi és mtsai. 1994), melyeket alaposan jellemezték fizikokémiai tulajdonságra és specifitásra nézve. Egy ORF-et, melyről feltételezték, hogy egy metallokarboxipeptidázt (YHT2) kódol, azonosítottak a *S. cerevisiae* genomprojektben (Johnston és mtsai. 1994).

Eddig a gombák közül a *Metarhizium anisopliae* cink-karboxipeptidáz (MeCPA) génszekvenciája ismert (Joshi és Leger 1999). Egy rovar patogén gomba, a *M. anisopliae* szekretálja a fertőzött szövetekbe, a pankréasz emésztőenzimeivel azonos funkciót lát el. A MeCPA szekretált (érett) formája aminosavszinten legközelebb a humán karboxipeptidáz A1 és A2 típushoz áll. Ellentétben a nagyon széles spektrumú A és B típusú bakteriális enzimekkel, a MeCPA-nak hiányzik a B típusú aktivitása, aminosavak elleni támadása. Az enzimatis bomlástermékek meghatározzák a MeCPA specifitását, mely szerint az emlős A típusú karboxipeptidázokhoz hasonlít leginkább. Evolúciós szempontból a gomba enzim egy köztes állapot az eltérő A és B forma és az A formán belül is az A1 és A2 izoformák között.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során egy kíméletesebb dekontaminációs eljárás (biológiai módszer) kifejlesztése volt a cél, mely lehetővé tenné a mezőgazdasági termények/termékek mikotoxin-szennyezettségének csökkentését.

Első lépésként célunk volt széles körben megvizsgálni számos mikroorganizmust (főleg fonalas- és élesztőgombafajokat), hogy rendelkeznek-e OTA-bontó képességgel.

Célunk volt toxinbontásra pozitívnak bizonyult mikrobák (pl. *Rhizopus* fajok, a *Ph. rhodozyma*) további vizsgálata, valamint a *Ph. rhodozyma* gombafaj OTA-adszorpciós és degradáló képességének vizsgálata, valamint annak tisztázása, hogy milyen enzim(ek) lehetnek felelősek a detoxifikációért. A következő kérdések merültek fel e téren:

- Milyen az izolátum OTA- bontásának kinetikája?
- Milyen hatással van a hőmérséklet az OTA-degradációra és az adszorpcióra?
- Milyen hatással van az OTA-adszorpcióra a különböző sejtkoncentráció és az időtartam?
- Esetleg az ochratoxin α -án kívül más bomlástermékek is keletkezhetnek (HPLC analízis)?
- Milyen hatással vannak a különböző karboxipeptidáz-inhibitorok az OTA-degradációra?

Terveink között szerepelt még a bontásért felelős enzim (karboxipeptidáz A) génjének azonosítása és klónozása a már korábban OTA- bontóként azonosított *A. niger* (CBS 120.49 / N400) gombaizolátumban, mivel korábbi vizsgálatok szerint egy karboxipeptidáz-szerű enzim lehet felelős az OTA bontásáért. Ezt a hipotézisünket az alábbi lehetőségekkel szeretnénk volna alátámasztani:

- A karboxipeptidáz A-t kódoló gén expresszáltatása *Pichia pastoris* élesztőfajban, így további információk szerzése az enzimfehérjéről.
- A karboxipeptidáz A-t kódoló gén expresszáltatása atoxinogén *Aspergillus* gombafajokban.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5./1.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek

A felhasznált mikroorganizmusok jegyzékét az 5. és 6. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: Az ochratoxin A-bontó képességre vizsgált 51 *Rhizopus* izolátum.

Labor kód	Izolátum	Eredeti kód	Izolátum eredete/szubsztrát
Rh 1	<i>Rh. stolonifer</i>	SZMC0506 Rp11	Illinois, USA/talaj
Rh 2	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM8A4	Fresno, California, USA/barack
Rh 3	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM8A6	Fresno, California USA/barack
Rh 4	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM8A7	Parlier, California USA,/barack
Rh 5	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM8A8	Parlier, California USA/barack
Rh 6	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM8A9	Parlier, California USA/barack
Rh 7	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM8A11	California, USA/-
Rh 8	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM8A12	Parlier, California,USA/barack
Rh 9	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM8B1	Turlock, California, USA/barack
Rh 10	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM8B2	Turlock, California, USA/barack
Rh 11	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM5D9	Tulare, California USA/ nektarin
Rh 12	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM5D10	Tulare, California USA/ nektarin
Rh 13	<i>Rh. oryzae</i>	TJM7F2	Califomia, USA/-
		<i>Rh. stolonifer</i> ként	
Rh 14	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM9C12	California, USA/-
Rh 15	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM9D1	Hanford, California USA/ barack
Rh 16	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM13FIO	Hanford, California, USA/barack
Rh 17	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM13FI1	Fresno, California, USA/barack
Rh 18	<i>Rh. stolonifer</i>	TJM24B2	Merced, California, USA/füge
Rh 19	<i>Rh. oryzae</i>	SZMCO495 Rp12	Magyarország/-
		<i>Rh. stolonifer</i> ként	
Rh 20	<i>Rh. oryzae</i>	TJM0502	Magyarország/-
		<i>Rh. circinans</i> ként	
Rh 21	<i>Rh. circinans</i>	SZMC0503	Magyarország/-
Rh 22	<i>Rh. circinans</i>	SZMC0504	Magyarország/-
Rh 23	<i>Rh. oryzae</i>	MUFSR5 <i>Rh.</i>	Dél-Afrika/-
		<i>microsporusként</i>	
Rh 24	<i>Rh. oryzae</i>	SZMC0497	Szeged/-
Rh 25	<i>Rh. circinans</i>	SZMC0498	Magyarország/-
Rh 26	<i>Rh. arrhizus</i>	NRRL1526	-/-
Rh 27	<i>Rh. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	NRRL514	Indonézia/fermentált élelmiszer
Rh 28	<i>Rh. tritici</i>	NRRL2908	Kína/kínai élesztő
Rh 29	<i>Rh. delmar</i>	NRRL1472	-/-
Rh 30	<i>Rh. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	NRRL6205	Indonézia/fermentált élelmiszer
Rh 31	<i>Rh. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	NRRL2710	Indonézia/fermentált élelmiszer
Rh 32	<i>Rh. homothallicus</i>	NRRL2538	Guatemala/talaj

Labor kód	Izolátum	Eredeti kód	Izolátum eredete/szubsztrát
Rh 33	<i>Rh. sp.</i>	SZMC 2001	Szeged/paradicsom
Rh 34	<i>Rh. sp.</i>	SZMC 2002	Szeged/őszibarack
Rh 35	<i>Rh. sp.</i>	SZMC 2003	Miskolc/-
Rh 36	<i>Rh. sp.</i>	SZMC 2004	Szeged/dió
Rh 37	<i>Rh. sp.</i>	SZMC 2005	Szeged/rizs
Rh 38	<i>Rh. sp.</i>	SZMC 2006	Szeged/rizs
Rh 39	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS609.82	-/Ragi (köles)
Rh 40	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS403.51	Japán/-
Rh 41	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS389.95.	-/-
Rh 42	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS347.49	Indonézia/fermentált élelmiszer
Rh 43	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS109.76	Svájc/kenyér
Rh 44	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS117.43	Hollandia/búza
Rh 45	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS320.35	-/-
Rh 46	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS319.35	-/-
Rh 47	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>lyococcus</i>	CBS398.95	-/-
Rh 48	<i>Rh. oryzae</i>	CBS112.07	Hollandia/-
Rh 49	<i>Rh. oryzae</i>	CBS260.28	Kína/kínai élesztő
Rh 52	<i>Rh. sp.</i>	SZMC 2007	Magyarország/-
Rh 54	<i>Rh. sp.</i>	SZNC 2008	Magyarország/-

6. táblázat: Az ochratoxin A bontó képességre vizsgált *Phaffia*/ *Xanthophyllomyces* izolátumok és a transzformációs kísérletek során alkalmazott *Pichia* és *Aspergillus* törzsek.

Izolátum neve	Kódja	Izolátum eredete
<i>Phaffia rhodozyma</i>	CBS 5905	Hollandia, CBS
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	CBS 5908	Hollandia, CBS
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	CBS 6938	Hollandia, CBS
<i>Pichia pastoris</i>	KM71H	EasySelect™ <i>Pichia</i> Expression Kit (Invitrogen)
<i>Pichia pastoris</i> (vad típus)	X-33	EasySelect™ <i>Pichia</i> Expression Kit (Invitrogen)
<i>Aspergillus niger</i>	CBS 120.49 / N400	Hollandia, CBS
<i>Aspergillus niger</i>	JHC 607	Anglia, J.H. Croft's fungal collection, University of Birmingham
<i>Aspergillus nidulans</i>	SZMC 0552 / WT0307	Magyarország, SZMC
<i>Aspergillus fumigatus</i>	NRRL 5587 / 52	Illinois, USA, NRRL
<i>Aspergillus niger</i>	T55L (eredet JHC607)	Az <i>Aspergillus</i> transzformációs kísérletekből származó törzs
<i>Aspergillus nidulans</i>	T55C (eredet SZMC 0552)	Az <i>Aspergillus</i> transzformációs kísérletekből származó törzs

5./1.2. A baktérium-transzformáció során alkalmazott törzsek

Escherichia coli TOP 10 F⁻ és DH5α törzset alkalmaztunk a munkánk során.

5./2.1. A törzsek tenyésztéséhez felhasznált táptalajok, tápoldatok

A *Rhizopus*, *Pichia* és *Aspergillus* törzsek tenyésztéséhez felhasznált táptalajok és tápoldatok:

Élesztő-szacharóz tápoldat (YES): 2% élesztő kivonat; 15% glükóz

Élesztő-glükóz tápoldat (YEG): 1% glükóz; 0,5% élesztőkivonat

Élesztő-glükóz táptalaj (YEG): 1% glükóz; 0,5% élesztőkivonat; 2% agar

Élesztő-pepton-glükóz táptalaj (YPD): 2% pepton, 2% glükóz, 1% élesztőkivonat, 2% agar

E. coli baktériumtörzsek tenyésztéséhez felhasznált táptalaj és tápoldat:

Luria-féle táptalaj (LB): 1% NaCl; 1% tripton; 0,5% élesztőkivonat; 1,5% agar

Luria-féle tápoldat (LB): 1% NaCl; 1% tripton; 0,5% élesztőkivonat

(Mindkét esetben 100 µg/ml ampicillin antibiotikummal egészítettük ki a transzformáns törzsek szelekciójához).

Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous élesztőtörzsek tenyésztéséhez felhasznált táptalaj és tápoldat:

Phaff-féle tápoldat (PM): 0,5% élesztőkivonat; 1% glükóz; 0,5% pepton; 0,2% maláta-kivonat (pH 6,0)

Phaff-féle táptalaj (PM): 0,5% élesztőkivonat; 1% glükóz; 0,5% pepton; 0,2% maláta-kivonat; 2% agar (pH 6,0)

5./2.2. Pufferek és oldatok

Genomi DNS tisztításhoz használt anyagok:

LETS puffer: 0,1 M LiCl; 10 mM EDTA; 10 mM Tris (pH 8); 0,5% SDS

PCI: fenol : kloroform : izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke

CI: kloroform : izoamilalkohol 24:1 arányú keveréke

RNáz A (Sigma) 10 mg/ml törzsoldat 10 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl oldatban

Gélelektroforézishez használt anyagok:

TAE puffer: 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6); 1 mM Na₂EDTA

Agaróz gél: 0,8% vagy 1% agaróz TAE pufferben oldva

Etídium-bromid törzsoldat (Sigma): 10 mg/ml desztillált vízben oldva

Mintapuffer: 40% szacharóz; 0,25 M brómfenolkék; 0,2 M EDTA; pH 8

6x DNS mintapuffer (Fermentas)

Kompetens *E. coli* sejtek készítéséhez és transzformációjához használt oldatok:

100 mM CaCl₂ oldat

TCM puffer: 10 mM Tris (pH 7,5); 10 mM CaCl₂; 10 mM MgCl₂

X-gal: 20 mg/ml dimetilformamidban oldva (Fermentas)

IPTG: 20 mg/ml steril desztillált vízben oldva (Fermentas)

Fehérje gélelektroforézishez használt oldatok:

Coomassie festő oldat: 0,0025% Coomassie Brilliant Blue R250; 40% metanol; 7% ecetsav (96%)

Festő oldat I.: 40% metanol; 7% ecetsav (96%)

Festő oldat II.: 7% ecetsav (96%); 5% metanol

5./2.3. A kísérletek során használt vektorok és indítószekvenciák (primerek)

A kísérletek során használt primereket a 7. táblázat mutatja be, az alkalmazott vektorokat pedig a 8 táblázat mutatja.

7. táblázat: A kísérletek során alkalmazott specifikus és degenerált primerek.

Oligonukleotid neve	T _m	Bázissorrend 5' - 3'
A <i>cpa</i> gén amplifikálásához használt degenerált primerek:		
ORCPA1	56,6°C	GCNGTNCCNGCNGGNWS
ORCPA2	42,8°C	GAYTGGATHATHGAR
CAPA6	52,7°C	CAYGCBMGBGARTGGATN
CPAR2	31,9-45,6°C	ACRTTTRTADATYTCYTT
CAPAR9	36,5°C	YTGRTGRTARAACCARTC
Az inverz PCR-hez felhasznált specifikus primerek:		
CPINV1	58°C	GCCAGTGCGGCAGATAACAA
CPINV2	49,3°C	GGTAATGAGCGTGTACATTA
CPINV3	55,4°C	ACCGGCAAGGAGATCTACAA
CPINV4	58,2°C	CGGGTTTTTCGATGCCCCAT
A vektorépítéshez felhasznált specifikus és degenerált primerek:		
CPAV1	59,8°C	CCTGGTACCAATGCGTCACCTC
CPAV2	63,3°C	GCCCCAGGCGCGGTCAAG
CPAV3	59,3°C	CAGCGGACCAGCCTACGG
CPAV4/a	70,7°C	ATGCGGCCGCGTCGTCGCCGA
CPAV4/b	64,3°C	CCTTCTAGATCAGCGTCGTCGCCGA
ORCPA2	42,8°C	GAYTGGATHATHGAR
CPAR2	31,9-45,6°C	ACRTTTRTADATYTCYTT

Oligonukleotid neve	T _m	Bázissorrend 5' - 3'
A hygromicin B rezisztenciagén ellenőrzéséhez felhasznált specifikus primerek:		
NYhph3	55,8°C	GTGGATATGTCCTGCGGGTA
NYhph4	61,4°C	CCGCTCGAAGTAGCGCGTCT

8. táblázat: A vektorépítéshez és transzformációs kísérletekhez felhasznált vektorok.

Plazmid neve	Méret	Szelekciós marker	Gyártó
A vektorépítéshez felhasznált plazmidok			
pCSN43	5350 bp.	Hygromicin B, ampicillin	tanszéki gyűjtemény
pGEM-T easy	3015 bp.	Ampicillin	Promega
pUC18	2686 bp	Ampicillin	Fermentas
pSK(+)	2961 bp	Ampicillin	Stratagene
pTZ57R	2886 bp	Ampicillin	Fermentas
pPICZα	3593 bp	Zeocin	Invitrogen
A kísérletek során megtervezett és összeépített plazmidok			
pN4	4958 bp	Ampicillin	megtervezett
pANCPA	7890 bp	Hygromicin B, ampicillin	megtervezett

5./2.4. A protoplasztálás és transzformálás során felhasznált elegyek, táptalajok és oldatok

A protoplasztálás során alkalmazott elegyek különböző törzsek esetében:

- A. *nidulans*** (SZMC 0552/WT0307): 0,02% novozym (Novo Trade Industry, Denmark), 1,5% csigaenzim, 0,7 M KCl oldatban
- A. *fumigatus*** (NRRL 5587/52): 0,02% novozym, 1,5% csigaenzim, 0,7 M KCl oldatban
- A. *niger*** (JHC607): 0,1% novozym, 1,5% csigaenzim, 0,7 M KCl oldatban

A protoplasztok stabilizálásához használt táptalaj:

Élesztő-glükóz táptalaj (YEG): 0,5% élesztő kivonat; 1% glükóz; 0,7M KCl; 1% agar (fedőagarként) vagy 2% agar (alapagarként)

Transzformálás során felhasznált táptalajok és oldatok:

MM (minimál tápoldat): 1% glükóz, 0,092% ammónium-tartarát, 0,052% KCl, 0,052% $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,152% KH_2PO_4 , (pH 6,8)

Ezen kívül 1 ml nyomelemoldat (*trace elements solution*) hozzáadása szükséges 1 liter tápoldathoz.

Nyomelemoldat: 0,1% $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1% $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,1% $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

MMS táptalaj (kiegészített MM tápoldat): 1 M szacharóz, 1% agar

Lágy agarú MMS táptalaj (kiegészített MM tápoldat): 1 M szacharóz, 0,35% agar

MS oldat: 1 M szorbitol, 10 mM MOPS puffer, (pH 6,5)

Sterilizés: szűrve 0,45 μm filteren.

MSC oldat: 1 M szorbitol, 10 mM MOPS puffer, 10 mM CaCl_2 , (pH 6,5)

Sterilizés: szűrve 0,45 μm filteren.

PEG oldat (w/v): 1 M szorbitol, 10 mM MOPS puffer, 10 mM CaCl_2 , 60% PEG 4000, (pH 6,5)

Sterilizés: szűrve 0,45 μm filteren.

5./2.5. Felhasznált egyéb vegyszerek/anyagok:

1 M NaOH (Reanal) és 1 M HCl (Scharlau) pH beállításához

Ampicillin (Sigma): 50 mg/ml törzsoldat steril desztillált vízben oldva

Ochratoxin A (OTA) 1mg/ml törzsoldat acetonitrilben oldva (Sigma-Aldrich Chemical Co.O1877)

Karboxipeptidáz A (bovine pankreász származék), (Sigma-Aldrich Chemical Co. C9268)

Karboxipeptidáz inhibitor burgonyából (*carboxypeptidase inhibitor from potato*), (Sigma C0279, 1 mg/ml)

Teljes mini proteáz inhibitoroktél-tabletta (Roche 11836170001, 25 mg/ml)

EDTA (Sigma 03677, 10 mM)

EGTA (Sigma E4378, 10 mM)

1,10-phenanthroline (Sigma P93765, 1 mM)

5./3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

5./3.1. Kísérleti módszerek *Rhizopus* izolátumok esetében

5./3.1.1. *Rhizopus* izolátumok mikotoxin-detoxifikáló képességének vizsgálata

A *Rhizopus* izolátumokat 2 ml 7,5 µg/ml OTA-t tartalmazó YES tápoldatba oltottuk le tömény spórasuszpenziót alkalmazva. A tenyészeteket 10 napig, 25°C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő után 2 ml kloroformmal extraháltuk a mintákat, így kivonva az OTA-t. Majd alapos vortexelés és centrifugálás (4000 rpm / 15-20 perc) után a szerves fázisból 1 ml-t kivettünk, ezt beszáritottuk és feloldottuk 100 µl diklórmétánban. Ebből 20 µl-t megfuttattunk vékonyréteg-lemezen (TLC) 6:3:1 arányú toluol : etil-acetát : hangyasav elegyben, melyet egy SYNGENE geldoc system készülékkel (kiegészítve egy UV 365 nm-es fényforrással, reflexiós üzemmódban) és egy GeneSnap software program segítségével értékeltünk ki. (Téren és mtsai. 1996).

5./3.1.2. Ochratoxin A bontási kinetika *Rhizopus* fajok esetében

A *Rhizopus* izolátumokat ebben a kísérletben is 2 ml YES tápoldatban növesztettük. A kiinduló toxinmennyiség 15 µl volt az 1 mg/ml OTA törzsoldatból (7,5 µg/ml végkoncentráció). Ezután 100 µl (*Rhizopus stolonifer*, *R. microsporus* fajok) spórasuszpenzióval beoltottuk a tápoldatokat. 14 napig 25°C-on inkubáltuk a tenyészeteket, az inkubációs idő alatt 2 naponta 2 ml kloroformmal extraháltuk az OTA-t egy-egy tenyészetből. A 14. nap végén alapos vortexelés és centrifugálás (4000 rpm / 15-20 perc) után a szerves fázisból 1 ml-t Eppendorf-csőbe mértünk. A mintákat az előzőekben leírtak szerint vizsgáltuk és elemeztük.

5./3.1.3. Ochratoxin A-degradációs modellkísérletek búzán

Félkémcsőenként 2 g búzát mértünk ki, melyet előkezeltünk: 10 percig 70%-os etanolban áztattuk, majd 2 percig mikrohullámú sütőbe tettük, ezáltal meggátoltuk más mikroorganizmusok jelenlétét a modellkísérlet során.

A mikotoxinból 15 µl-t mértünk 1 mg/ml-es OTA törzsoldatból a búzára, 2 ml acetonnal jutattuk a búza szöveteibe a toxint, majd megvártuk, amíg megszáradnak a búzaszemek. Grammonként 0,2 ml steril csapvíz hozzáadásával a mintákat leoltottuk tömény spórasuszpenzióval. A tenyészeteket 14 napig inkubáltuk 25°C-on. Az inkubációs idő után 3-szor 2 ml diklórmétánnal átmostuk a búzaszemeket, majd leöntöttük és beszáritottuk a szerves fázist. Ezután 2 ml kloroformban feloldottuk és hozzáadtunk 2 ml

NaHCO₃-t, majd lecentrifugáltuk (4000 rpm / 20 perc). A 2 ml NaHCO₃-t (vizes fázis) átmértük tiszta félkémcsőbe, ehhez hozzáadtunk 450 µl HCl-t és 2 ml diklórmétánt. Alapos vortexelés és centrifugálás (4000 rpm / 20 perc) után a diklórmétán-oldatot szintén átmértük tiszta félkémcsőbe és beszárítottuk, majd 100 µl diklórmétánban újra feloldottuk, és ebből 20 µl-t felvittünk vékonyréteg-lemezre.

2-2 db félkémcsövet használtunk gombatörzsenként, plusz mindegyikhez 3 kontrollt:

1. kontroll cső: 2 g búza + 0,4 ml steril csapvíz
2. kontroll cső: 2 g búza + 15 µl OTA (1 mg/ml törzsoldat)
3. kontroll cső: 2 g búza + 0,4 ml tömény spóraszuszpenzió

5./3.2. Kísérleti módszerek *Phaffia rhodozyma* esetében

5./3.2.1. *Phaffia/Xanthophyllomyces* izolátumok OTA-bontó képességének vizsgálata

Két ml 7,5 µg/ml OTA-t tartalmazó PM tápoldatot *Phaffia/Xanthophyllomyces* fajok tömény sejtsuszpenzióival leoltottunk és 20°C-on 14 napig fényen inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a mintákat az előzőleg leírt módon extraháltuk és vizsgáltuk.

A bontáskinetikai vizsgálatokhoz 11 napos *P. rhodozyma* sejt kultúrát oltottunk 2 ml 7,5 µg/ml OTA-t tartalmazó PM tápoldatba kétféle koncentrációban (2x10⁷ és 6x10⁸ sejt/ml). A sejt kultúrát 1, 3, 5, 7, 11, 13 és 15 napon keresztül inkubáltuk 20°C-on. Ezután a sejteket elválasztottuk a folyékony tápoldattól centrifugálással (3500 rpm / 10 perc), a fermentlét 2 ml diklórmétánnal extraháltuk, majd a szerves fázist áttettük egy tiszta kémcsőbe és folyadék-folyadék tisztítást végezve összekevertük 2 ml 1% NaHCO₃-al. Ezután lecentrifugáltuk és a vizes fázist pH 2-re beállítottuk, az OTA-t újra extraháltuk ugyanolyan térfogatú diklórmétánnal. Az élesztősejteket 0,5 ml desztillált vízben szuszpendáltuk és ugyanúgy kezeltük őket, mint a fermentlét. Ugyanúgy az extrahált mintákból 20 µl-t megfuttattunk vékonyréteg-lemezen.

Megvizsgáltuk a hőmérséklet hatását az OTA bontásra. Három napos *P. rhodozyma* sejt kultúrát leoltottunk 2 ml PM tápoldatba, mely 5 µg/ml OTA-t tartalmazott. A sejt kultúrákat 1 és 3 napig inkubáltuk különböző hőmérsékleten (10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C). Az inkubációs idő után a sejteket elválasztottuk a folyékony tápoldattól centrifugálással (3500 rpm / 10 perc), majd az OTA-t tartalmazó fermentlét és sejteket az előzőleg leírt módon extraháltuk és vizsgáltuk.

Későbbi kísérletben megnéztük az OTA-t bontó enzim aktivitását nagyobb hőmérséklet tartományban. Három napos *P. rhodozyma* sejt kultúrát hőkezeltünk különböző

hőmérsékleteken (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C) 15-20 percig. Kezelés után a *P. rhodozyma* sejteket 2 ml 5 µg/ml OTA-t tartalmazó PM tápoldatba oltottuk le. A tesztcsöveket 3 napig inkubáltuk 30°C-on, majd a sejteket elválasztottuk a folyékony tápoldattól centrifugálással (3500 rpm / 10 perc). A sejteket és a fermentlét az előzőleg leírt módon extraháltuk és vizsgáltuk.

5./3.2.2. HPLC-analízis

100 µl OTA-t tartalmazó diklórmétánból 20 µl-t megfutattunk vékonyréteg-lemezen (TLC), a maradékot beszáritottuk és feloldottuk 200 µl eluensben (acetonitril : desztillált víz : ecetsav elegye 99:99:2 arányban), majd lecentrifugáltuk (13000 rpm / 10perc), és ezt az oldatot HPLC-analízisnek vetettük alá.

HPLC-körülmények:

- SYKAM S1100 pumpa (Solvent Delivery System)
- SYKAM S5110 injektor 20 µl-es loop-al
- BST Rutin (Bioszeparációs Technika Budapest) C18 10 µm BD oszlop (200x54mm)
- Fluoreszcenciás detektor: (Linear FLUOR LC305), gerjesztés: 334 nm, emisszió: 460 nm, áramlási sebesség: 1 ml/perc
- PEAKSIMPLE SOFTVER (9,8 retenció idővel jött le a toxin)
- Észlelés (Linear UVIS 200) UV detektorral 333 nm-nél

Az ochratoxin α standard készítéséhez 1 mg OTA-t feloldottunk 11 ml pufferben (0,1 M NaCl, 0,02 M Tris, pH 7,5) és emésztettük karboxipeptidáz A-val (62 U) 2 napig 25°C-on. Az ochratoxin α -t háromszor extraháltuk 2 térfogatnyi diklórmétánnal, a szerves extraktumot egyesítettük és beszáritottuk. Végül az ochratoxin α -t feloldottuk 1 ml eluensben (acetonitril : desztillált víz : ecetsav elegye 99:99:2 arányban) és 5-10 µl mennyiséget használtunk fel a HPLC-analízishez.

5./3.2.3. OTA-adszorpciós kísérlet

Három napos *P. rhodozyma* sejt kultúrát 20 percig forraltunk. A kezelés után a hőkezelt és nem-hőkezelt (élő) sejteket különböző sejt koncentrációban (10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} sejt/ml) leoltottuk 3 µg/ml OTA-t tartalmazó PM tápoldatba. A két órás inkubáció után 20°C-on, a

sejteket elválasztottuk a folyékony tápoldattól centrifugálással (3500 rpm / 10 perc) és az előzőekben leírt módon analizáltuk.

Megvizsgáltuk az inkubációs idő hosszúságának az OTA-adszorpcióra gyakorolt hatását. Három napos *P. rhodozyma* sejt kultúrát 15-20 percig forraltunk, majd a lecentrifugált sejteket 2 ml 3 µg/ml OTA-t tartalmazó PM tápoldatba oltottuk. Ezeket a sejt kultúrákat rázatással (200 rpm) különböző inkubációs ideig (2h, 4h, 8h, 10h, 24h, 32h) teszteltük. Ezután a sejteket elválasztottuk a folyékony tápoldattól centrifugálással (3500 rpm / 10 perc). Mind a sejteket mind fermentlét diklórmétánnal extraháltuk és TLC-analízist végeztünk az előzőleg leírt módon.

5./3.2.4. OTA-bontásért felelős enzim extracelluláris vagy intracelluláris kiválasztódásának meghatározása

Az OTA-bontásért felelős enzim indukálásához a *P. rhodozyma* sejteket 3 napig 7,5 µg/ml OTA-t tartalmazó PM tápoldatban neveltük elő. Ezután a lecentrifugált sejteket újra leoltottuk friss PM tápoldatba (indukált sejt). Az indukált és nem-indukált 11 napos *P. rhodozyma* sejt kultúrákat centrifugálással elválasztottuk a tápoldattól, majd ezt a fermentlét áthelyeztük egy steril kémcsőbe kiegészítve 2,5 µg/ml OTA-val. Ugyanakkor a lecentrifugált indukált és nem-indukált sejteket friss, 2 ml-nyi 5 µg/ml OTA-t tartalmazó PM tápoldatba oltottuk. A teszt kémcsöveket 6 napig inkubáltuk 30°C-on. Az egyes kémcsöveknél a sejteket naponta elválasztottuk a tápoldattól centrifugálással (3500 rpm / 10 perc). Mind a fermentlé, mind a sejtek OTA-mennyiségét az előzőekben leírt módon vizsgáltuk.

5./3.2.5. Proteáz- és karboxipeptidáz-inhibitorok hatása az OTA-bontásra *P. rhodozyma* esetében

Két ml 5 µg/ml OTA-t tartalmazó PM tápoldatot, leoltottunk *P. rhodozyma* tömény sejt szuszpenziójával. Két mintával dolgoztunk, az egyik sorozathoz melléeltünk karboxipeptidáz-inhibitorokat a másikkal nem. Majd 24 és 72 óráig inkubáltuk 30°C-on. Tesztelt inhibitorok: karboxipeptidáz-inhibitor burgonyából, teljes mini proteáz inhibitoroktól-tabletta, EDTA, EGTA és 1,10-fenantrolin. A kontroll kémcsövek csak PM tápoldatot tartalmaztak, inhibitor nem. Az inkubáció letelte után a sejteket elválasztottuk a tápoldattól centrifugálással (3500 rpm / 10 perc), majd mind a fermentlé, mind a sejtek OTA-tartalmát vizsgáltuk az előzőekben leírt módon.

5./3.3. A *cpa* gén amplifikálásához alkalmazott módszerek

5./3.3.1. Genomi DNS kivonása *Aspergillus* fajokból

A liofilizált micéliumból 50 mg-ot kimértünk félkémcsőbe, ehhez hozzáadtunk 2 ml LETS puffert és üveggyöngyöket. Összekeverés után 1 ml PCI-vel kezeltük, majd ismét összekevertük (vortex). Ezt követően lecentrifugáltuk (3000 rpm / 10 perc) a felülúszót tiszta félkémcsőbe átöntöttük, majd 4 ml 96%-os etanollal kicsaptuk és -70°C-on inkubáltuk 1 órán keresztül. Ismét lecentrifugáltuk (3000 rpm / 5 perc) és leöntöttük róla az etanolt, és ami a félkémcső alján maradt, azt beszárítottuk (liofilezés). A beszáradt mintákat 0,7 ml bidesztillált vízben feloldottuk és áthelyeztük Eppendorf-csövekbe, 1 µl RNáz-t hozzáadva. Ezután a mintákat 37°C-on 30-45 percig tároltuk, az inkubációs idő letelte után 0,5 ml PCI-t adtunk hozzá és lecentrifugáltuk (13000 rpm / 10 perc). A felülúszót steril Eppendorf-csőbe mértük át és 0,5 ml kloroform : i-amilalkoholt adtunk hozzá. Centrifugálás (13000 rpm / 10 perc) után a felülúszóhoz kétszeres térfogatú 96%-os etanolt adtunk, majd -70°C-on tároltuk 1 órán keresztül. Ismételt centrifugáltuk (13000 rpm / 10 perc) a mintákat, majd lepipettázva róluk az etanolt beszárítottuk és a kívánt mennyiségű (100 µl) bidesztillált vízben feloldottuk.

5./3.3.2. A polimeráz láncreakció körülményei

PCR-elegy: (25 µl végtérfogat)

- 0,5 µl *Pfu* DNS polimeráz (2,5u/µl)
- 2,5 µl 10x *Pfu* puffer 20mM MgSO₄-al
- 5 µl dNTP mix
- 1-1 µl primer
- 1 µl genomi DNS
- 14 µl bidesztillált víz

Az amplifikálás körülményei: (1. program)

- | | | |
|---------|---------|---------------|
| 1. 95°C | 3 perc | (1 ciklus) |
| 2. 93°C | 1 perc | } (5 ciklus) |
| 3. 52°C | 30 mp. | |
| 4. 72°C | 3 perc | |
| 5. 93°C | 1 perc | } (35 ciklus) |
| 6. 40°C | 30 mp. | |
| 7. 72°C | 3 perc | |
| 8. 72°C | 10 perc | |

5./3.3.3. DNS-gélelektroforézis

A nukleinsavak elválasztására agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk. A mintákat 0,8 illetve 1%-os 0,5 µg/ml etídium-bromidos festéket tartalmazó agaróz/TAE gélen választottuk el. Paraméterek: 80 V / 44 mA, 1-1,5 óra futattási idő. A nukleinsavak detektálása UV-fényben történt. A fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb-os illetve pUC mix molekulasúly-markereket (Fermentas) alkalmaztunk.

5./3.3.4. DNS izolálása agaróz gélből

A kívánt fragmentet tartalmazó gélszakaszt steril pengével UV-lámpa alatt kivágtuk, majd egy Eppendorf-csőbe helyeztük. Az izolálást a *DNA Extraction Kit*-nek (Fermentas) megfelelően végeztük, a gyártó utasításai szerint.

5./3.3.5. DNS fragmentumok klónozása

Ligálási reakció (10 µl végtérfogat):

- 7 µl DNS fragment
- 1 µl EcoR V-emésztett pSK(+) plazmid
- 1 µl T4 DNS-ligáz enzim (5 u/µl)
- 1 µl T4 DNS-ligáz puffer

A ligálás 16 órán át, 4°C-on történt.

5./3.3.6. Kompetens sejtek készítése

E. coli TOP10F⁻ törzsének 14 órás LB tápoldatban nevelt tenyészetéből 1 ml-t 100 ml LB tápoldatba átvéve a baktériumokat OD₆₀₀=0,6 érték eléréséig növesztettük (200 rpm / 37°C). A tenyészetet centrifugáltuk (4000 rpm / 10 perc, 4°C), majd a sejteket azonos mennyiségű 4°C-os, 100 mM-os CaCl₂ oldatban felfüggesztettük. Az előbbi műveletet megismételtük, majd a 100 mM-os, 4°C-os CaCl₂ oldatban felvett sejteket 1 órán át jégfürdőben inkubáltuk, ezt követően újra centrifugáltuk (4000 rpm / 10 perc, 4°C). A kiülepedett sejteket 1/20 térfogatú, 100 mM-os 20% glicerol-tartalmú, hideg CaCl₂ oldatban szuszpendáltuk fel és 200 µl mennyiségként Eppendorf-csövekbe osztottuk szét, ezeket -70°C-on fagyasztva tároltuk.

5./3.3.7. Baktériumtranszformáció

Kétszáz µl fagyasztva tárolt kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 10 µl ligátumot (plazmidot) és 100 µl TCM puffert adtunk hozzá. 25 perc inkubálás után (4°C), 4 percig 37°C-on tartottuk (hősokk). Ezt követően a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. A mintákból különböző mennyiségeket ampicillin-tartalmú LB táptalajra szélesztettük 40 µl IPTG és 40 µl X-gal jelenlétében. A transzformáns sejteket 37°C-on 16-20 óráig tenyésztettük. A felhasznált *E. coli* törzs a kromoszómán hordozza a β-galaktozidáz enzim C-terminálisát kódoló részt, amely önmagában funkcióképtelen. A transzformációhoz használt vektor (az antibiotikum-rezisztencia génje mellett) a fehérje N-terminális, önmagában szintén működésképtelen α-peptidjét kódolja. E két protein azonban az interallélikus komplementációhoz hasonlóan funkcióképes fehérjekomplexet alkot a sejtben, aminek következtében a baktériumsejtek IPTG induktor és X-gal szubsztrát jelenlétében kékek lesznek. Az α-peptidet kódoló génszakasz klónozóhelyeire beépült inszert azonban inaktiválja azt, így az ilyen plazmidot hordozó baktériumsejtek IPTG és X-gal jelenlétében is fehérek maradnak.

5./3.3.8. Plazmidtisztítás

Három ml 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB tápoldatban rázatott (200 rpm / 14-16 óra) transzformáns *E. coli* sejteket tenyésztettünk. A felnevelt transzformáns sejtekből a plazmid DNS-t a *Viogene Mini-MTM Plasmid DNA Extraction System* (Viogene) Kit, illetve a *Viogene Midi-V100TM Plasmid DNA Extraction System* (Viogene) Kit segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai szerint.

5./3.3.9. DNS szekvenciák meghatározása és elemzése

A vizsgálatainkban elemzett DNS-szakaszok szekvenálása az MTA Szegedi Biológiai Központjában történt. A nukleotidsorrend meghatározását *Applied Biosystem* 373 DNA sequencer automata szekvenátorral végezték el. A DNS-szekvenciák ellenőrzése a Chromas program (1.5 verzió, Technelysium) segítségével történt. A DNS szakaszok összehasonlítását nemzetközi adatbázisokban (NCBI Genbank, EMBL) fellelhető szekvenciákkal végeztük. A karboxipeptidáz enzim filogenetikai törzsfáját aminosav-szekvenciák összehasonlítása és illesztése alapján Clustal W2 program segítségével készítettük el.

5./3.3.10. Inverz PCR reakciókörülményei

N400 genomi DNS emésztése (100 µl végtérfogat):

- 50 µl genomi DNS
- 10 µl puffer (restrikciós enzimnek megfelelő)
- 2 µl restrikciós enzim
- 38 µl bidesztillált víz

Emésztés 37°C-on egy éjszakán át, majd hőinaktiválás (20 perc).

Ebből 7 µl-t megfuttattunk a restrikciós emésztés ellenőrzése céljából. Kétszeres térfogatnyi, 96%-os etanollal kicsaptuk, ezt követően -70°C-on 3 órát inkubáltuk. Centrifugáltuk (12000 rpm / 20 perc), majd beszárítottuk a mintákat, és 17 µl bidesztillált vízbe oldottuk fel a ligálási reakcióhoz.

Ligálási reakció (20 µl végtérfogat):

- 17 µl DNS-minta
- 2 µl T4 DNS-ligáz puffer
- 1 µl T4 DNS-ligáz enzim (5 u/µl)

A ligálás 16 órán át 4°C-on történt. Ebből 2 µl-t használtunk fel az inverz PCR-hez.

Inverz PCR reakcióelegy: (25 µl végtérfogat)

- 0,5 µl Taq-polimeráz (5 u/µl)
- 2,5 µl MgCl₂
- 2,5 µl dNTP mix
- 2,5 µl Taq-polimeráz puffer (10x)
- 2-2 µl primer
- 11 µl bidesztillált víz
- 2 µl emésztett genomi DNS

Az amplifikálás körülményei: (2. program)

- | | | |
|---------|--------|-------------------------------|
| 1. 94°C | 2 perc | (1 ciklus) |
| 2. 94°C | 15 mp. | } (10 ciklus) |
| 3. 54°C | 20 mp. | |
| 4. 68°C | 3 perc | |
| 5. 94°C | 15 mp. | } (20 ciklus) |
| 6. 54°C | 30 mp. | |
| 7. 68°C | 3 perc | |
| 8. 68°C | 7 perc | (primer: + 5mp. ciklusonként) |

5./3.4. A pN4 vektor építéséhez alkalmazott módszerek

A restriktációs emésztéseket a standard módszerek szerint végeztük (Sambrook és mtsai. 1989), mindig az adott körülményekhez optimalizálva. A DNS-fragmentumokat a lépésenként megfelelő vektorokba ligáltuk. A ligálást T4 DNS-ligázzal (Fermentas) 16 órán keresztül 18°C-on végeztük, majd 10 perces, 65°C-os hőkezeléssel állítottuk le a reakciót. Vektorépítéshez a pBluescript II SK(+) és pTZ57R vektorokat (Fermentas) használtuk. A plazmid-DNS tisztításához a hagyományos módszereken kívül a *Viogene Mini-MTM Plasmid DNA Extraction System* (Viogene), illetve a *Viogene Midi-V100TM Plasmid DNA Extraction System* (Viogene), a PCR során kapott fragmentumok tisztításához pedig a *PCR-MTM Clean Up System* (Viogene) kitéket használtuk.

PCR-elegy: (25 µl végtérfogat)

- 0,5 µl *Pfu* DNS-polimeráz (2,5 u/µl)
- 2,5 µl 10x *Pfu* puffer 20 mM MgSO₄-al
- 5 µl dNTP mix
- 1-1 µl primer
- 1 µl genomi DNS
- 14 µl bidesztillált víz

Az amplifikálás körülményei: A program megegyezik az 5./3.3.2. pontban leírt 1. programmal. A primer-bekötési hőmérséklet primer-páronként eltérő.

5./3.5. A *Pichia pastoris* expressziós rendszer alkalmazása

Kísérleteinket az *EasySelect Pichia Expression Kit*-nek (Invitrogen) megfelelően végeztük, a gyártó utasítása szerint. Pl.: *Pichia* expressziós vektor készítése (PICZ α + *cpa* gén), *E. coli* transzformálása, *Pichia pastoris* transzformálása, rekombináns *Pichia pastoris* (KM71H) törzs expresszálatása.

5./3.5.1. Fehérjetisztítás fermentléből

A rekombináns *Pichia pastoris* élesztősejtek expresszálatása közben, a fermentléből az 1., a 4., és a 7. napon kivett 1 ml mintát kisóztuk telített 5,6 M (NH₄)₂SO₄ oldattal 1:1 arányban. Megforgatás után lecentrifugáltuk (12000 rpm / 30 perc), majd a mintákat feloldottuk 0,5 ml TRIS-OH/HCl 0,02 M pufferbe (pH 7), ezután sómentesítő oszlopon átszűrtük (Millipore, Ultracel YM-100) és ismét centrifugáltuk a mintákat (14000 rpm / 12

perc). A szűrletet -70°C-on fagyasztottuk és egy éjszakán át liofileztük. Ezt követően a mintákat 20 µl TRIS-OH/HCl 0,02 M pufferben (pH 7) oldottuk fel a fehérje gélelektroforézishez.

5./3.5.2. Fehérje gélelektroforézis

A fehérjemintákat NuPAGE^R Novex (4-12%) Bis-Tris gélen (Invitrogen) választottuk el. Paraméterek: 125 mA (200 V), 35 perc; marker: 10 µl SeeBlue^R Plus 2 (lot. SBB 41129). Futató puffer: 1X SDS puffer (50 ml 20X NuPAGE^R MES puffer, 950 ml desztillált víz)

Minták előkészítése: (25 µl végtérfogat)

15 µl minta TRIS-OH/HCl 0,02 M pufferben

2,5 µl LDS puffer

7,5 µl bidesztillált víz

A gélelektroforézis után gélfestést végeztünk.

5./3.5.3. Nem transzformáns *Pichia pastoris* törzsek (KM71H, X-33) tesztelése OTA-bontásra

Két ml 5 µg/ml OTA-t tartalmazó YPD tápoldatot beoltottunk 100 µl KM71H és X-33 sejtszuszpenzióval ($2,5 \times 10^6$ /ml). A tenyészeteket rázatva (200 rpm / 30°C) 5 napig inkubáltuk. Az inkubációs idő után, a sejteket elválasztottuk a folyékony tápoldattól centrifugálással (3500 rpm / 10 perc), az OTA-t tartalmazó fermentlét és sejteket az előzőleg leírt módon extraháltuk és vizsgáltuk.

5./3.5.4. *Pichia pastoris* transzformáns törzsek (KM71H: 1/1, 1/2, 3/1, 3/2) tesztelése OTA-bontásra

A transzformáns *Pichia pastoris* (KM71H) törzsek expresszáltatását az *EasySelect Pichia Expression Kit*-nek (Invitrogen) megfelelően végeztük, a gyártó utasításai szerint. Ezután a sejteket lecentrifugáltuk (3500 rpm / 5 perc), a felülúszót (fermentlé) tovább ráztuk 30°C-on 1 µg/ml OTA hozzáadása mellett 5 napig. Naponta vettünk mintát, melyet az előzőekben leírtak szerint extraháltunk és vizsgáltunk.

5./3.6. *Aspergillus* fajok pANCPA vektorral történő transzformálása

5./3.6.1. A pANCPA vektor építéséhez felhasznált módszerek

A kísérletekhez felhasznált módszerek megegyeznek az 5./3.4. pontban leírtakkal. A vektorépítéshez felhasznált vektorokat a 8. táblázat tartalmazza.

5./3.6.2. *Aspergillus* törzsek protoplasztálása

Fonalgomba-sejtek protoplasztképzését rázatott YEG tápoldatban nevelt tenyészetekből végeztük. Az inkubáció 30°C-on (200 rpm) 16-18 órán keresztül történt. Ezt követően a tenyészeteket leszűrtük és desztillált vízzel, illetve 0,7 M KCl oldattal mostuk. A sejtfal oldására a fajnak megfelelő novozym-mel kiegészített 1,5% csigaenzimet alkalmaztunk. A protoplasztáló enzimeket 0,7 M KCl oldatban oldottuk fel a protoplasztok stabilizálása érdekében. Ezután 3-4 órás inkubáció következett szobahőmérsékleten, melyet követően a protoplasztokat steril gézen átszűrtük, majd centrifugáltuk (3000 rpm / 8 perc). Ezt követően a felülúszót leöntöttük, majd 1 ml 0,7 M KCl oldatban felvettük a protoplasztokat.

5./3.6.3. Nem transzformáns *Aspergillus* törzsek MIC-értékeinek meghatározása hygromicin B-re

A protoplasztok számát meghatároztuk Bürker-kamra segítségével, hogy a továbbiakban 30 illetve 300 db protoplaszttal tudjunk dolgozni csészénként. Ezután a protoplasztokat fedőagarba keverve különböző koncentrációjú (0, 25, 50, 75, 100 és 150 µg/ml) hygromicin B-t tartalmazó YEG (pH 6,5) táptalajra öntöttük ki. A csészéket 30°C-on 3 illetve 7 napig inkubáltuk. Későbbiekben az *A. nidulans* (WT0307) törzset magasabb hygromicin B-koncentráción (0, 50, 100, 150, 200 és 300 µg/ml) is növesztettük.

5./3.6.4. *Aspergillus* fajok transzformálása (Tilburn és mtsai. 1983, Malardier és mtsai. 1989)

Három-négy órás protoplasztálás után a protoplasztokat steril gézen átszűrtük, majd lecentrifugáltuk (3000 rpm / 8 perc). Ezt követően a protoplasztokat kétszer átmostuk MSC oldattal. A végén annyi MSC oldatban vettük fel, hogy a végtérfogat 1-2 x 10⁷ protoplaszt / ml legyen. Ehhez hozzámértünk 1 µg lineáris plazmid-DNS-t és még 50 µl 60%-os PEG oldatot, homogenizáltuk majd 20 percig inkubáltuk jégen. Ezt követően még hozzáadtunk 500 µl 60%-os PEG oldatot, ismételten homogenizáltuk és 20-30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubáció után lecentrifugáltuk (13000 rpm / 5 perc),

majd eltávolítottuk a PEG oldatot a protoplasztokról. 200 µl MSC oldatban felszuszpendáltuk a protoplasztokat és hozzáadtuk 3 ml 40°C fokos, lágy agarú MMS táptalajhoz. Ezt követően az előre elkészített MMS táptalajos csészékre öntöttük a protoplasztokat. Miután megszilárdult a táptalaj, egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a csészéket, hogy expresszáldjon a hygromycin B rezisztencia génje. A következő napon a táptalaj felszínére 3 ml lágy agarú MM táptalajt öntöttünk, mely a törzsenként meghatározott MIC-értéknek (µg/ml) megfelelő koncentrációban hygromycin B-t tartalmazott. Ezután 12 óránként passzálást alkalmaztunk, így fokozatosan növeltük a táptalaj hygromycin B-tartalmát. A harmadik nap után felnőtt 1-2 telepet áthelyeztük hygromycin B-t tartalmazó minimál táptalajra.

5./3.6.5. Nem transzformáns és transzformáns *Aspergillus* törzsek tesztelése OTA-bontásra

A vizsgálatot 4 db nem transzformáns, és 2 db transzformáns *Aspergillus* törzssel [*A. niger* (CBS 120.49), *A. niger* (JHC607), *A. nidulans* (SZMC 0552), *A. fumigatus* (NRRL 5587), *A. niger* (T55L), *A. nidulans* (T55C)] végeztük el. A törzseket 2 ml YES tápoldatban vizsgáltuk, mely 2,5 µg/ml mennyiségben OTA-t tartalmazott. A leoltás 20 µl spóraszuszpenzióval (10^7 /ml) történt, a mintákat 30°C-on 9 napig inkubáltuk. Mintavétel a 1., 3., 5., 7., és 9. napon történt, a mintákat az előzőekben leírtak szerint extraháltuk és vizsgáltuk.

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLŐK

6./1.1. *Rhizopus* izolátumok mikotoxin-detoxifikáló képességének vizsgálata. (VARGA ÉS MTSAL. 2005B)

Számos mikroorganizmust vizsgáltak már, hogy képes-e lebontani vagy átalakítani az OTA-t nem toxikus ochratoxin α -vá, vagy más kevésbé toxikus vegyületekké. A mi célunk is az volt, hogy a *Rhizopus* és a *Phaffia/Xanthophyllomyces* izolátumok között keressünk olyan törzset, mely képes lebontani az OTA-t. Korábban e törzsek OTA-bontó képességét még nem tesztelték. Ötvenegy *Rhizopus* izolátum OTA-bontó képességét teszteltünk YES tápoldatban. A tenyészeteket 10 napig 25°C-on inkubáltuk, majd az OTA extrahálását az 5./3.1.1. pontban leírtak szerint végeztük el. A kísérleti eredményeinkből megállapítottuk, hogy az 51 tesztelt izolátum közül 15 képes az OTA bontásra, míg 2 további izolátum esetében részleges OTA-bontást tapasztaltunk (9. táblázat). A toxin-bontásra képes törzsek közül kiválasztottunk egy *Rh. stolonifer* (Rh 5) és egy *Rh. microsporus* (Rh31) törzset, melyek hatékonyan eliminálták az OTA-t a tápoldatból. Ezen törzsek esetében részletesebben vizsgáltuk a mikotoxin-bontás kinetikáját is.

9. táblázat: Ochratoxin A-bontó képességre vizsgált *Rhizopus* izolátumok. Jelölések: - nem bontja az adott mikotoxint, + bontja az ochratoxin A-t, (+) csak részleges toxinbontás történik.

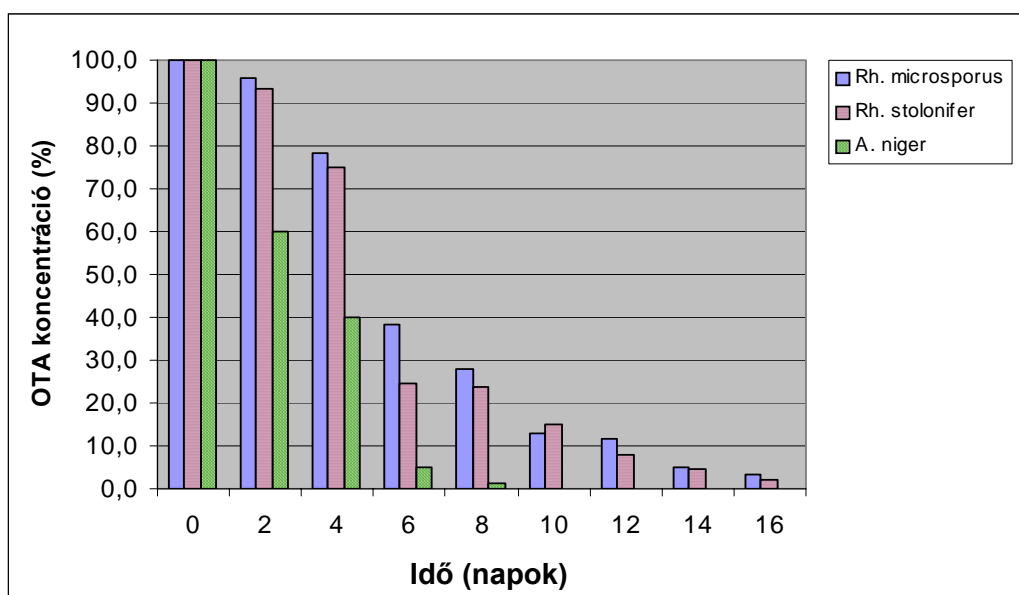
Laborkód	Fajnév	Eredeti kód	OTA-bontás
Rh 1	<i>Rhizopus stolonifer</i>	SZMC0506 Rp11	(+)
Rh 2	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM8A4	-
Rh 3	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM8A6	+
Rh 4	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM8A7	-
Rh 5	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM8A8	+
Rh 6	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM8A9	+
Rh 7	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM8A11	+
Rh 8	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM8A12	-
Rh 9	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM8B1	-
Rh 10	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM8B2	-
Rh 11	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM5D9	+
Rh 12	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM5D10	-
Rh 13	<i>Rhizopus oryzae</i>	TJM7F2	-
		<i>Rh. stolonifer</i> ként	
Rh 14	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM9C12	-
Rh 15	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM9D1	-
Rh 16	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM13FIO	-
Rh 17	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM13FII	-
Rh 18	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM24B2	-
Rh 19	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMCO495 Rp12	-
		<i>Rh. stolonifer</i> ként	

Laborkód	Fajnév	Eredeti kód	OTA-bontás
Rh 20	<i>Rhizopus oryzae</i>	TJM0502	-
		<i>Rh. circinans</i> ként	-
Rh 21	<i>Rhizopus circinans</i>	SZMC0503	-
Rh 22	<i>Rhizopus circinans</i>	SZMC0504	-
Rh 23	<i>Rhizopus oryzae</i>	MUFSR5 <i>Rh.</i> <i>microsporusként</i>	-
Rh 24	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC0497	-
Rh 25	<i>Rhizopus circinans</i>	SZMC0498	-
Rh 26	<i>Rhizopus arrhizus</i>	NRRL1526	+
Rh 27	<i>Rh. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	NRRL514	-
Rh 28	<i>Rhizopus tritici</i>	NRRL2908	(+)
Rh 29	<i>Rhizopus delmar</i>	NRRL1472	+
Rh 30	<i>Rh. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	NRRL6205	-
Rh 31	<i>Rh. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	NRRL2710	+
Rh 32	<i>Rhizopus homotallicus</i>	NRRL2538	+
Rh 33	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2001	+
Rh 34	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2002	-
Rh 35	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2003	-
Rh 36	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2004	-
Rh 37	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2005	+
Rh 38	<i>Rhizopus</i> sp	SZMC 2006	-
Rh 39	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS609.82	-
Rh 40	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS403.51	-
Rh 41	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS389.95.	+
Rh 42	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS347.49	+
Rh 43	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS109.76	-
Rh 44	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS117.43	-
Rh 45	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS320.35	-
Rh 46	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS319.35	-
Rh 47	<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>lyococcos</i>	CBS398.95	-
Rh 48	<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS112.07	-
Rh 49	<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS260.28	-
Rh 52	<i>Rhizopus</i> sp	SZMC 2007	+
Rh 54	<i>Rhizopus</i> sp	SZNC 2008	+

6./1.2. Ochratoxin A-bontási kinetika *Rhizopus* fajok esetében

Az OTA lebontásának kinetikáját *Rh. stolonifer* (Rh 5) és *Rh. microsporus* (Rh 31) izolátumokban vizsgáltuk folyékony YES tápoldatban. A vizsgálat során a tenyészeteket 25°C-on, 14 napig inkubáltuk, az inkubációs idő alatt 2 naponta mintát vettünk, melyeknek megvizsgáltuk az OTA-tartalmát. A kísérlet során összehasonlításként az *A. niger* CBS 120.49/N400 törzset is használtuk, mivel korábban már e törzs bontási kinetikáját részletesen tanulmányozták. (Varga és mtsai. 2000b). Az izolátumok bontási kinetikáját az 5. ábra mutatja be. A vékonyréteg-kromatográfiás analízis kimutatta, hogy *Rhizopus*

izolátumok (Rh 5, Rh 31) esetében az OTA viszonylag lassan tűnt el a tápoldatból. Míg az *A. niger* az OTA 90%-át 6 napos inkubáció alatt volt képes degradálni, addig a *Rhizopus* izolátumok az OTA 90%-át csak 12-14 nap elteltével voltak képesek elbontani. A vizsgált két *Rhizopus* izolátum (Rh 5, Rh 31) toxinbontása között nem tapasztaltunk jelentős eltéréseket. A vizsgálat során minden tesztelt izolátum esetében a fermentlében kimutatható volt az ochratoxin α , mint degradációs termék. Irodalmi adatok alapján az OTA-bontásáért feltételezhetően egy karboxipeptidáz enzim aktivitása lehet a felelős (Abrunhosa és mtsai. 2002).

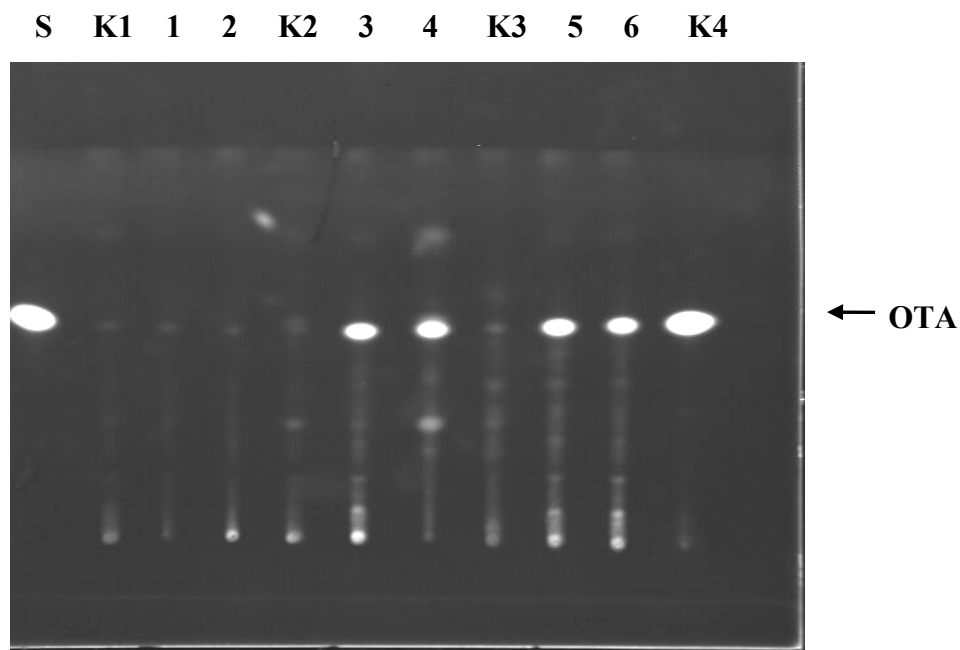


5. ábra: Ochratoxin A bontási kinetikája *Rhizopus stolonifer* TJM 8A8 (Rh5), *Rhizopus microsporus* NRRL 2710 (Rh31) és *Aspergillus niger* CBS 120.49 (N400) törzsek esetében.

6./1.3. Ochratoxin A-degradációs modellkísérlet búzán

Kíváncsiak voltunk, hogy a YES tápoldatban OTA-bontásra képes izolátumok természetes körülményeket modellező kísérleti rendszerben is képesek-e erre a tulajdonságra. A modellkísérlet során három izolátum, az *A. niger* CBS 120.49, a *Rh. stolonifer* Rh 5 és a *Rh. microsporus* Rh 31 ochratoxin-bontó aktivitását vizsgáltuk búzán, úgy hogy a búzaszemeket OTA-val mesterségesen szennyeztük, és erre oltottuk rá a toxinbontó izolátumokat. Mindhárom izolátum esetében két párhuzamos tenyésztettel dolgoztunk, melyeket 14 napig, 25°C-on inkubáltunk. Minden izolátum esetében 3 kontrollt alkalmaztunk: **1.** kontroll csak búzát és steril csapvizet tartalmazott. **2.** kontroll csak búzát

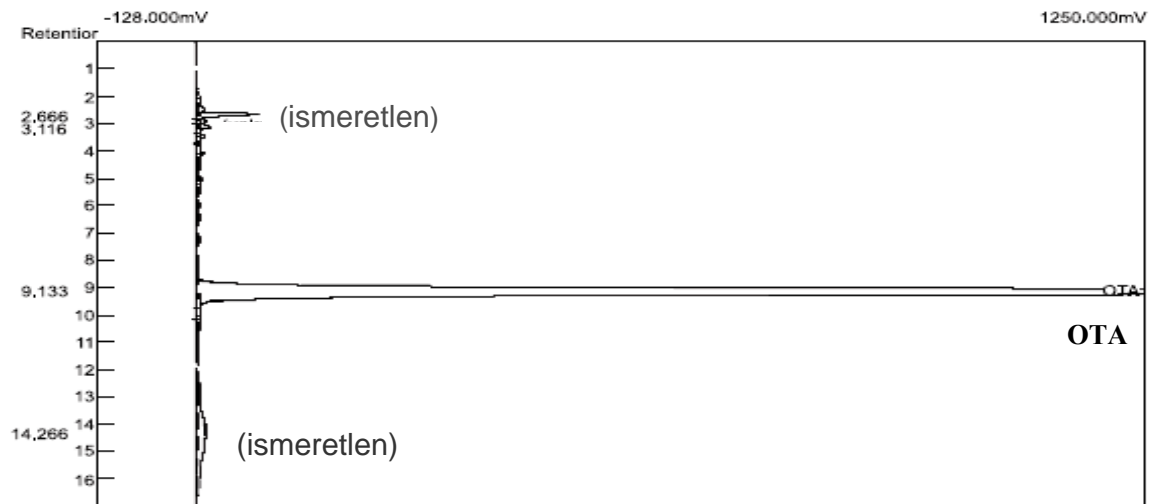
és OTA-t tartalmazott. 3. kontroll csak búzát és a vizsgálandó izolátum tenyészetét tartalmazta. Természetes körülmények között a mikroorganizmusok szaporodását a szubsztrátum (jelen esetben a búza) nedvességtartalma határozza meg leginkább. Szempont volt egy minimális nedvességtartalom biztosítása, mivel ez alatti értéknél már nem életképesek az izolátumaink. A minimális vízaktivitás-igény fajoként eltérő lehet: a *Rhizopus*-fajok minimális vízaktivitás-igénye $a_w = 0,93$, az *Aspergillus* fajok minimális vízaktivitás-igénye $a_w = 0,8$. Ezen szempontoknak megfelelően próbáltuk beállítani a körülményeket. A modellkísérlet során mindhárom izolátum szemmel láthatóan jól növekedett a szubsztrátumon. Az inkubációs idő letelte után a tenyészetek OTA-tartalmát az alkalmazott módszerek 5./3.1.3. pontban leírtak szerint vizsgáltuk. A kísérleti eredmények alapján a két *Rhizopus* izolátum közül csak az egyik volt képes lecsökkenteni a toxintartalmat ezen körülmények között. Meglepődve tapasztaltuk, hogy az *A. niger* CBS 120.49 izolátum, – mely tápfolyadékos kísérletekben a legjobb toxinbontónak bizonyult – sem volt képes lebontani az OTA-t. Tehát az alkalmazott paraméterek mellett csak a *Rh. stolonifer* (Rh 5) izolátum esetében tapasztaltunk toxinbontást. Feltehetően a másik két izolátum ezen körülmények között nem megfelelően tudta hasznosítani a szubsztrátumot a növekedéshez, vagy az OTA-bontáshoz szükséges enzim(ek) expressziója nem indukálódott. A következő ábrán látható a vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálat eredménye, ahol a jól látható foltok az ochratoxin-tartalmat jelzik (6. ábra).



6. ábra: Ochratoxin-degradációs modellkísérlet vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) képe.

Jelmagyarázat: **S:** standard ochratoxin A (2 µg), **K1:** negatív kontroll, mely nem tartalmazott ochratoxin A-t, csak a *Rhizopus stolonifer* Rh 5 izolátumot, **K2:** negatív kontroll, mely nem tartalmazott ochratoxin A-t, csak a *Rhizopus microsporus* Rh 31 izolátumot, **K3:** negatív kontroll, mely nem tartalmazott ochratoxin A-t, csak az *Aspergillus niger*. CBS 120.49 izolátumot, **1, 2:** *Rhizopus stolonifer* Rh 5 párhuzamos tenyészet, **3, 4:** *Rhizopus microsporus* Rh 31 párhuzamos tenyészet, **5, 6:** *Aspergillus niger* CBS 120.49 párhuzamos tenyészet. **K4:** pozitív kontroll, mely csak ochratoxin A-t tartalmazott a búzán kívül.

A *Rh. stolonifer* Rh 5 OTA-bontását HPLC-analízissel is bizonyítottuk (7. ábra). A HPLC - kromatogramokon látható, hogy a bevitt OTA (mesterségesen toxinnal szennyezett búzaminta) 96,5%-át lebontotta a *Rh. stolonifer* Rh 5 izolátum búzán, 14 nap inkubálás után. Az, hogy a *Rh. stolonifer* Rh 5 képes lebontani az OTA-t szennyezett búzamintákon, ígéretes biológiai detoxifikáló eljárásnak tűnik a szennyezett mezőgazdasági termékekre nézve. E törzs ipari célokra való felhasználása még további vizsgálatokat tesz szükségessé.



(a)



(b)

7. ábra: Az ochratoxin A-degradációs modellkísérlet HPLC-kromatogramja.

A felső ábrán a *Rhizopus stolonifer* Rh 5 izolátummal nem kezelt búzaminta HPLC-kromatogramja látható, mely csak az adott ochratoxin A-mennyiséget tartalmazza. Az alsó ábrán pedig ochratoxin A-val és *Rhizopus stolonifer* Rh 5 izolátummal fertőzött búzaminta HPLC-kromatogramja látható.

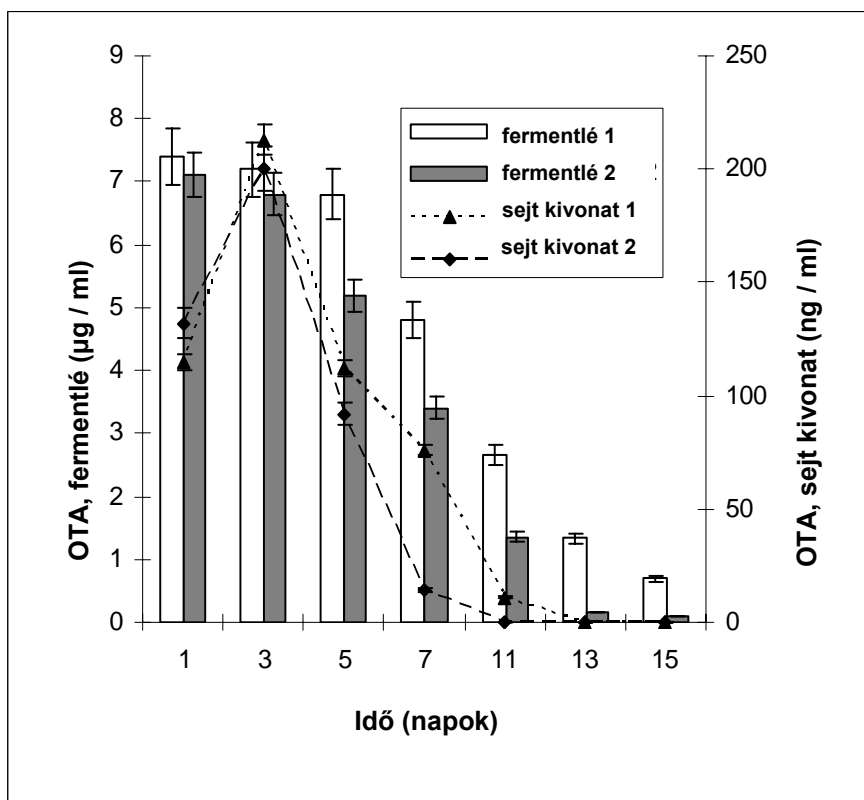
6./2.1 *Phaffia/Xanthophyllomyces* izolátumok ochratoxin A-bontó képességének elemzése. (PÉTERI ÉS MTSAI. 2007)

Számos tanulmány foglalkozott már a *S. cerevisiae* izolátumok OTA-lebontó és adszorbeáló képességével kapcsolatban. Ebből kiindulva a *Rhizopus* izolátumok mellett még megvizsgáltunk néhány *Phaffia/Xanthophyllomyces* élesztő-izolátumot is, hogy rendelkeznek-e ezzel a képességgel. Előzetes kísérletek során három *Phaffia/Xanthophyllomyces* élesztő-izolátumot (CBS 5905, CBS 5908, CBS 6938) alkalmaztunk az OTA-bontó képesség vizsgálatára. A tenyészeteket OTA hozzáadásával 14 napig, 20°C-on inkubáltuk, majd OTA-tartalmukat az 5./3.2.1. pontban leírtak szerint vizsgáltuk. A kísérletből kiderült, hogy ezen élesztő-izolátumok kevesebb, mint 10 nap alatt lebontják vagy adszorbeálják az OTA-t PM tápoldatból. A vizsgált izolátumok közül is a *Ph. rhodozyma* CBS 5905 izolátum bizonyult a legjobbnak. További vizsgálataink során már csak a *Ph. rhodozyma* CBS 5905 izolátumra koncentráltunk.

Későbbiekben a kísérleteinket irodalmi adatok alapján terveztük meg (Bejaoui és mtsai. 2004). A *Ph. rhodozyma* CBS 5905 izolátum OTA-bontási kinetikáját kétféle sejtkoncentrációval (2×10^7 / ml és 6×10^8 / ml) végeztük el PM tápoldatban 15 napig, 20 °C-on. Kétnaponta vettünk mintát a tenyészetekből, majd a fermentlé és a sejtek OTA-tartalmát külön-külön vizsgáltuk az alkalmazott módszerek 5./3.2.1. pontban leírtak szerint. A 8. ábrán látható, hogy már a 7. napon az OTA-mennyiség 50%-a eltűnt a PM tápoldatból, és további 7 nap után a teljes toxinmennyiség 90%-át lebontotta a *Phaffia rhodozyma* izolátum. A sejtextraktumból kiderül, hogy az első két napban a *Phaffia* élesztősejtek adszorbeálják az OTA-mennyiség egy részét is a lebontás mellett, majd az adszorpció is folyamatosan csökken. A kísérleti eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a *Ph. rhodozyma* izolátum az OTA-bontó képessége mellett OTA-adszorpciós képességgel is rendelkezik.

A *Ph. rhodozyma* CBS 5905 izolátum OTA-bontási kinetikájának vizsgálatán kívül még további kísérleteket végeztünk el, hogy az OTA-bontásért felelős enzim extracellulárisan vagy intracellulárisan választódik-e ki. A kísérlet során indukált és nem-indukált sejtkultúrákból indultunk ki. Az OTA-bontásért felelős enzim indukálásához a *Ph. rhodozyma* sejteket 3 napig OTA-t tartalmazó PM tápoldatban előneveltük (indukált sejt). Ezzel a tenyészettel párhuzamosan készítettünk egy normál sejtkultúrát is, mely nem tartalmazott OTA-t (nem indukált sejt). Az inkubációs idő letelte után a sejteket különválasztottuk a fermentlevektől, majd az indukált és nem indukált fermentleveket és sejteket OTA hozzáadásával újból 6 napig, 30°C-on inkubáltuk. Az inkubáció azért történt

30°C-on, hogy további sejtszaporodás ne történjen. A fermentlevek és a sejtek OTA-tartalmát külön-külön vizsgáltuk az alkalmazott módszerek 5./3.2.4. pontban leírtak szerint. A kísérleti eredményekből kiderült, hogy sem az OTA-val indukált sejtek, sem a nem indukált sejtek fermentleve nem volt képes degradálni a hozzáadott OTA-t. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy az enzim(ek), mely a toxin bontásáért lehet felelős, nem választódik ki a fermentlébe, hanem sejthez kötöttek lehetnek.



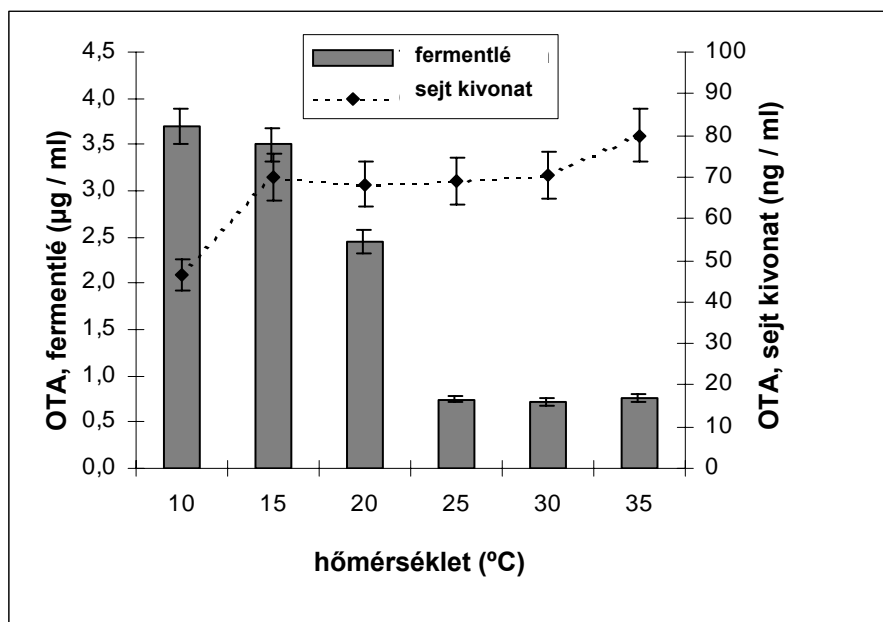
8. ábra: A *Phaffia rhodozyma* CBS 5905 izolátum ochratoxin A-bontási kinetikája.

Az **1.** fermentléhez és sejtextraktumhoz tartozó kiindulási sejtkoncentráció 2×10^7 / ml, a **2.** fermentléhez és sejtextraktumhoz tartozó kiindulási sejtkoncentráció 6×10^8 / ml. Az ábrán feltüntettük a három független kísérletből származó szórási értékeket is.

További vizsgálatokat végeztünk annak tisztázására, hogy milyen hatással lehetnek a különböző hőmérsékleti viszonyok a *Ph. rhodozyma* OTA bontására nézve. Három napos *Ph. rhodozyma* sejtkultúrát tovább oltottunk OTA-t tartalmazó PM tápoldatba, mely tenyészeteket három napig, különböző hőmérsékleteken (10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C) inkubáltunk. A fermentlevek és a sejtek OTA-tartalmát külön-külön vizsgáltuk az alkalmazott módszerek 5./3.2.1. pontban leírtak szerint. Azt tapasztaltuk, hogy az OTA

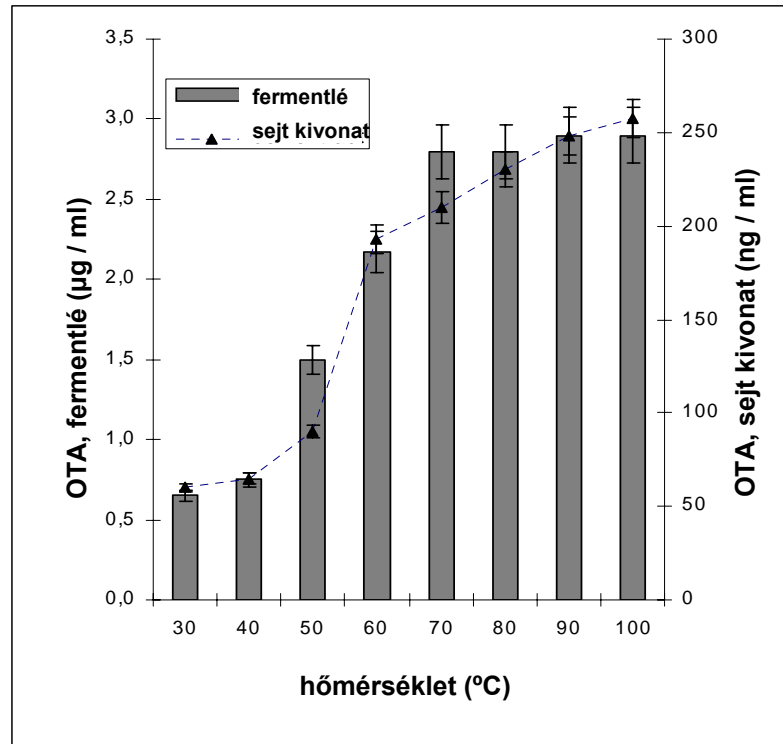
bontása 25 és 35°C között a legnagyobb (9. ábra), annak ellenére, hogy a *Ph. rhodozyma* izolátum optimális növekedéséhez szükséges hőmérséklet 20°C. Érdekes, hogy az OTA-degradáció 20°C-on jóval elmaradt a 25 és 35°C-hoz képest. A sejtek OTA-adszorpciója viszont enyhe emelkedést mutat 30 és 35°C-on, feltehetően a nagyszámú elpusztult sejt miatt, amit a korábbi irodalmi adatok és a később ismertetett kísérletek is alátámasztanak.

További vizsgálatokat végeztünk magasabb hőmérsékleteken is (egészen 100°C-ig). Három napos *Ph. rhodozyma* sejt kultúrát hőkezeltünk különböző hőmérsékleteken (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C) 15-20 percig. A kezelést követően továbboltottuk a *Ph. rhodozyma* sejteket OTA-t tartalmazó PM tápoldatba, majd a tenyészeteket 3 napig 30°C-on inkubáltuk. Az inkubáció azért történt 30°C-on, hogy további sejtszaporodás ne történjen. A fermentlevek és a sejtek OTA-tartalmát külön-külön vizsgáltuk az alkalmazott módszerek 5./3.2.1. pontban leírtak szerint. A kísérleti eredményekből kiderült, hogy a bontásért felelős enzim(ek) aktivitása egészen 60°C-ig megmaradt, bár ezen a hőmérsékleten már jóval kisebb mértékű volt az OTA-bontás, mint 25 vagy 35°C-on (10. ábra). Az e feletti hőmérsékleteken az OTA-degradáció helyett inkább az OTA-adszorpció vette át a szerepet, mely a sejtextraktum OTA-tartalmából is kiderült (10. ábra).



9. ábra: A *Phaffia rhodozyma* CBS 5905 izolátum ochratoxin A-bontása 10 és 35 °C között.

Az ábrán feltüntettük a három független kísérletből származó szórási értékeket is.



10. ábra: A *Phaffia rhodozyma* CBS 5905 izolátum ochratoxin A-bontása 30 és 100 °C között.

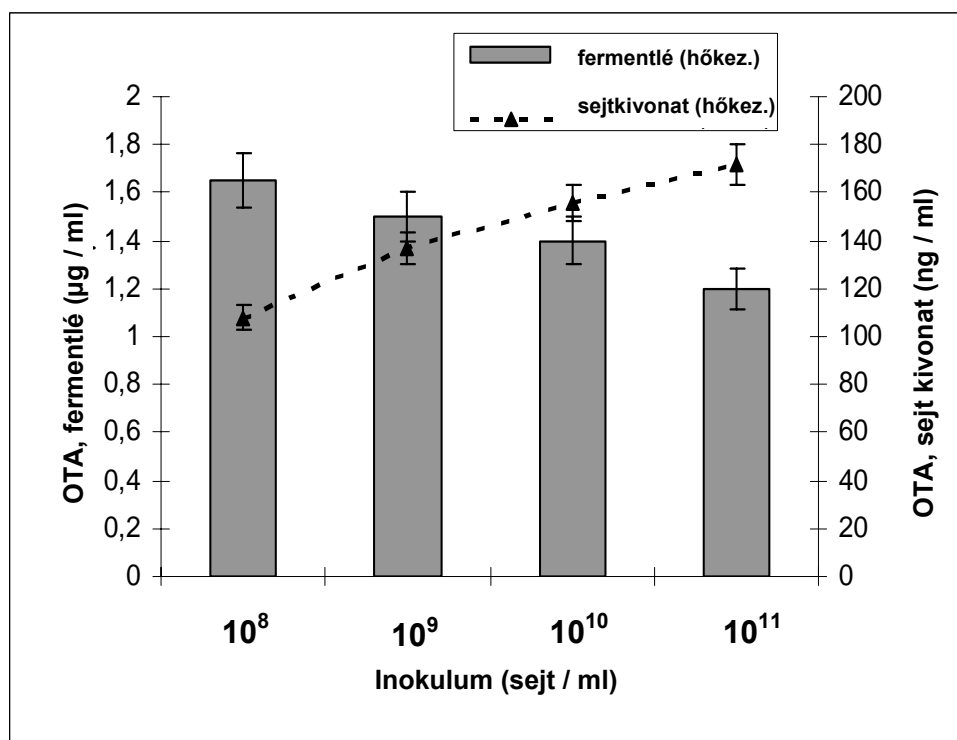
Az ábrán feltüntettük a három független kísérletből származó szórási értékeket is.

6./2.2 A *Phaffia rhodozyma* ochratoxin A-adszorpciós képessége

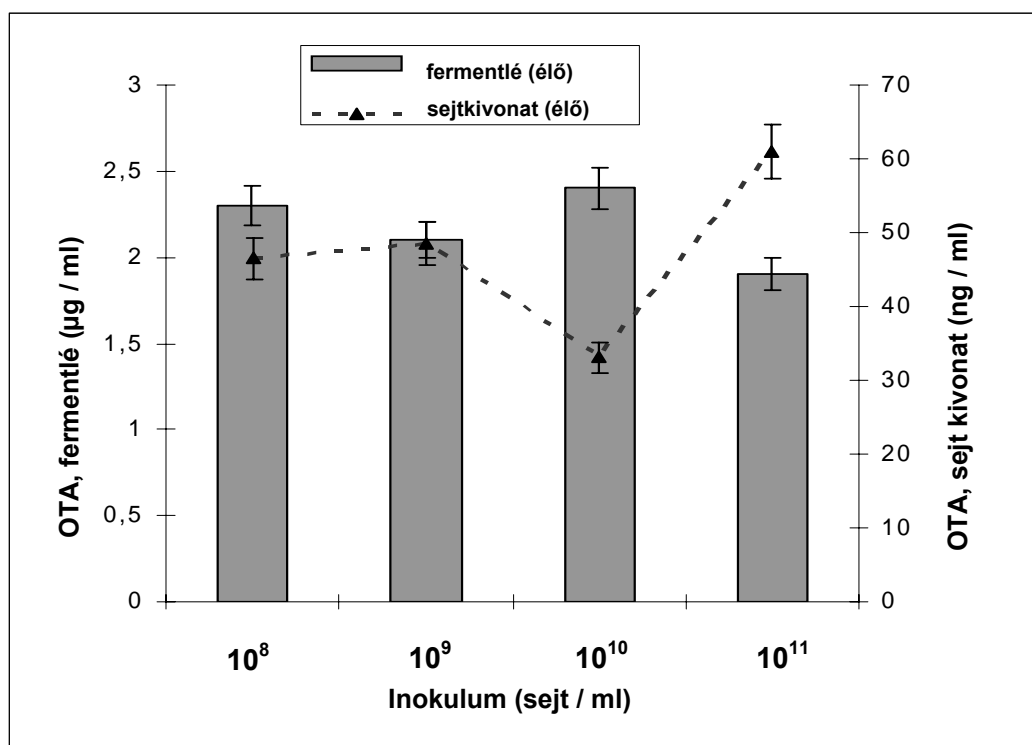
A degradációs kísérletek mellett megvizsgáltuk a *Ph. rhodozyma* CBS 5905 izolátum OTA-adszorbeáló képességét is. Kísérleteinket Bejaoui és mtsai. 2004-es cikkéből kiindulva terveztük meg. Összehasonlítottuk az élő és a hőkezelt élesztősejtek OTA-adszorbeáló képességét négyféle sejtkoncentráció (10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} sejt/ml) esetében. A kísérlet során háromnapos *Ph. rhodozyma* sejtkultúrát 20 percig hőkezeltünk. Ezzel párhuzamosan háromnapos nem hőkezelt *Ph. rhodozyma* sejtkultúrát is alkalmaztunk. A kezelés után a hőkezelt és nem hőkezelt (élő) sejteket különböző sejtkoncentrációban (10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} sejt/ml) leoltottuk OTA-t tartalmazó PM tápoldatba. A tenyészeteket két óráig 20°C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő után a fermentlevek és a sejtek OTA-tartalmát külön-külön vizsgáltuk a korábban ismertetett módszerek alapján. Azt tapasztaltuk, hogy a hőkezelt élesztősejtek esetében jelentősebb volt az OTA-adszorpció, mint az élő sejteknél. Emellett pozitív összefüggést tapasztaltunk a hőkezelt élesztősejtek toxinmegkötő képessége és a növekvő sejtkoncentráció között (11a. ábra), míg az élő sejteknél nem volt összefüggés a sejtkoncentráció és a sejtek adszorbeáló képessége között

(11b. ábra). Bejaoui és mtsai. eredményei alapján az élesztősejtek hőkezelése megnövekedett adszorpcióhoz vezet, amit mi is tapasztaltunk a kísérletek során.

Megvizsgáltuk, hogy lehet-e összefüggés az inkubációs idő hosszúsága és a sejtek adszorbeáló képessége között. A kísérlet során háromnapos *Ph. rhodozyma* sejt kultúrát 15-20 percig hőkezeltünk, majd a sejt kultúrákat OTA-t tartalmazó PM tápoldatba oltottuk. Ezen sejt kultúrákat rázatással különböző ideig (2h, 4h, 8h, 10h, 24h, 32h) inkubáltuk. Az inkubációs idő után a fermentlevek és a sejtek OTA-tartalmát külön-külön vizsgáltuk az alkalmazott módszerek 5./3.2.3. pontban leírtak szerint. A kísérleti eredmények alapján azt tapasztaltuk, hogy nincs jelentős eltérés a különböző ideig inkubált tenyészetek OTA-adszorbeáló képessége között.



(a)



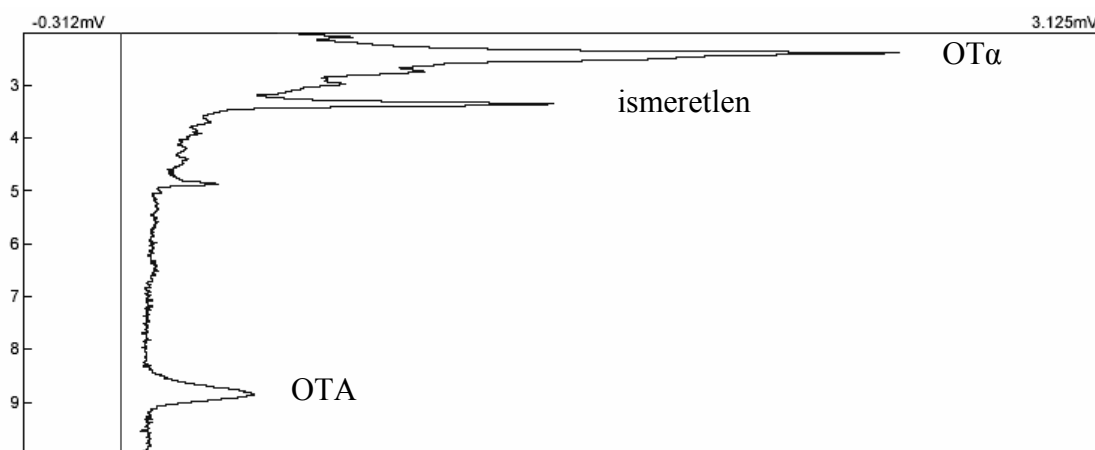
(b)

11. ábra: (a) A *Phaffia rhodozyma* CBS 5905 izolátum ochratoxin A-adszorpciós ábrája hőkezelt élesztősejtek esetében. (b) A *Phaffia rhodozyma* CBS 5905 izolátum ochratoxin A-adszorpciós ábrája nem hőkezelt (élő) élesztősejtek esetében. Négyféle sejtkoncentrációt alkalmaztunk: 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} . Az ábrán feltüntettük a három független kísérletből származó szórési értékeket is.

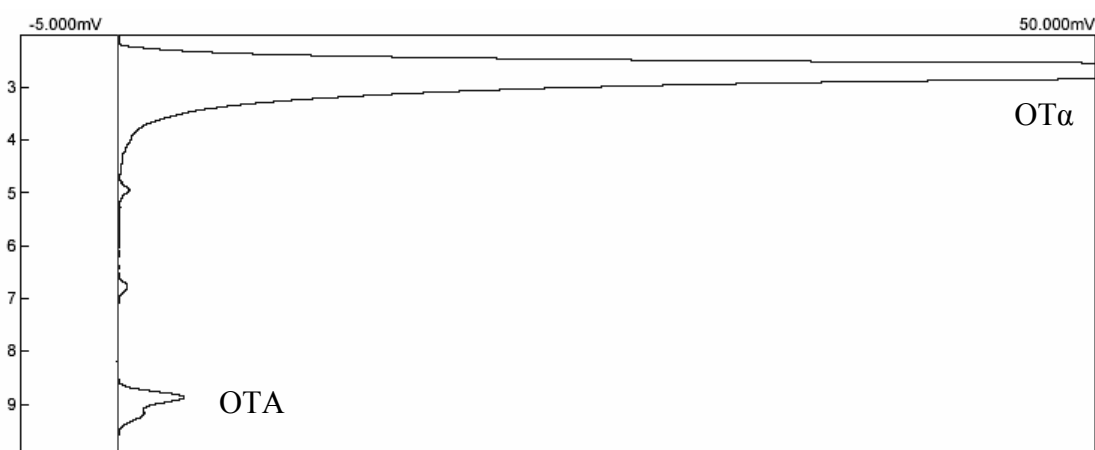
6./2.3 Proteáz és karboxipeptidáz inhibitorok hatása az ochratoxin A-bontásra *Phaffia rhodozyma* esetében

Az OTA-bontás kinetikájának vizsgálata során a fermentlevekből detektáltunk ochratoxin α bomlásterméket TLC-val és HPLC-technikával is (12. ábra). Korábbi irodalmi adatok alapján arra következtettünk, hogy a *Ph. rhodozyma* CBS 5905 izolátum esetében is egy karboxipeptidáz enzim lehet felelős az OTA-bontásért, mint ahogy már más gombafajoknál kimutatták (Abrunhosa és mtsai. 2002, Varga és mtsai. 2000). A feltételezésünkben kiindulva megvizsgáltuk különböző karboxipeptidáz inhibitorok hatását az OTA-bontására nézve *Ph. rhodozyma* izolátumnál. A kísérletek során tesztelt karboxipeptidáz és proteáz inhibitorok: karboxipeptidáz inhibitor burgonyából, teljes mini proteáz inhibitoroktól-tabletta, EDTA, EGTA és 1,10-fenantrolin. A *Ph. rhodozyma* sejtkultúrákat leoltottuk OTA-t tartalmazó PM tápoldatokba, melyekhez hozzáadtuk a különböző inhibitorokat. A különböző inhibitorokkal kezelt tenyészetek mellett

párhuzamosan kontroll tenyészetet is alkalmaztunk. A tenyészeteket 24 és 72 óráig, 30°C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő után a fermentlevek és a sejtek OTA-tartalmát külön-külön vizsgáltuk az alkalmazott módszerek 5./3.2.5. pontban leírtak szerint. Az inhibitorok közül kettő bizonyult hatásosnak, ez a kettő kelátoló ágens (EDTA, 1,10-fenantrolin) melyek jelentősen gátolták az OTA bontását az élesztősejtekénél. A többi inhibitornak nem volt jelentős gátló hatása az OTA-bontásra. A kísérleti eredményekből arra következtettünk, hogy a degradációt végző enzim feltehetően egy metalloproteáz (10. táblázat). Érdekes, hogy a kísérlet során a karboxipeptidázokat gátló EGTA nem volt gátló hatással az OTA-bontásra (ez az ágens elsősorban Ca^{2+} -ionokat köt meg). Ebből arra következtettünk, hogy az OTA-bontásért feltehetően felelős enzim működéséhez valamilyen más fém ion szükséges.



(a)



(b)

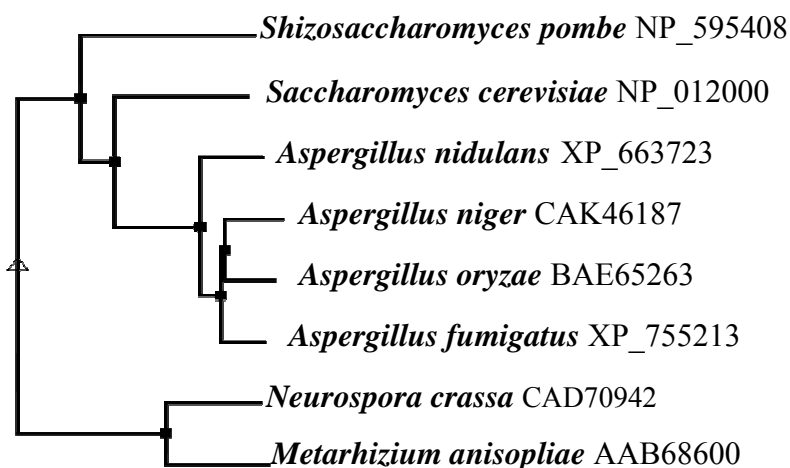
12. ábra: Ochratoxin A *Phaffia rhodozyma* élesztősejtek általi degradációjának HPLC-kromatogramja (a). Kontroll ochratoxin A-bontás: ochratoxin A-degradáció HPLC-kromatogramja karboxipeptidáz A enzimmel történő inkubáció esetén (b).

10. táblázat: Különböző karboxipeptidáz- és proteáz-inhibitorok hatása az ochratoxin A-degradációra *Phaffia rhodozyma* CBS 5905 izolátum esetében. A fermentlevekből származó ochratoxin A-mennyiségek %-ban vannak feltüntetve.

	24 óra inkubálás utáni OTA-mennyiség (%)	72 óra inkubálás utáni OTA-mennyiség (%)
CPA inhibitor	40.0	28.0
EDTA	77.0	68.8
EGTA	32.8	29.2
1,10-fenantrolin	87.5	81.3
Proteáz inhibitor	42.9	19.9
Kontroll	52.5	34.0

6./3. A *cpa* kódoló gén klónozása *Aspergillus niger* CBS 120.49 / N400 törzsből.

Számos mikroorganizmus képes lebontani az OTA-t ochratoxin α -vá, amely konverzióért feltehetően a karboxipeptidáz A enzim a felelős. Tanszékünkön korábban elvégzett kísérletek során néhány *Aspergillus* izolátum jó OTA-bontó képességet mutatott (Varga és mtsai. 2000b). Ezért az egyik már korábban vizsgált *A. niger* CBS 120.49 izolátumból megkezdjük a bontásért felelős enzimet kódoló gén klónozását. Kísérleteink során az NCBI szekvencia-adatbázisban található adatokból indultunk ki. Vizsgálatainkat megnehezítette, hogy gombákban fellelhető metallokarboxipeptidázok (karboxipeptidáz A) génszekvenciájáról alig van adat, ezen kívül különböző törzseknél nagyfokú eltérések vannak a *cpa* gén szekvenciáiban (nem konzervált régiók) (13. ábra).



13. ábra: A karboxipeptidáz A enzim filogenetikai törzsfája
A fajnevek mellett láthatók a (metallo)karboxipeptidázok aminosav-szekvenciáinak azonosító számai a NCBI honlapján lévő szekvencia-adatbázis szerint.

A már ismert szekvenciák konzervált régióiról tervezett degenerált primerek segítségével próbáltuk megtalálni a *cpa* kódoló gént. Az alkalmazott degenerált primereket a 7. táblázat mutatja. Ezeket a primereket a 13. ábrán bemutatott törzsek adatbanki *cpa* gént kódoló szekvenciái alapján terveztük meg. A degenerált primerek közül a CAPA6–CAPAR9 primerpár bizonyult megfelelőnek, a várt mérettartomány 600 és 700 bázispár volt. A *Pfu* DNS-polimerázzal amplifikált tompa végű fragmentumokat izolálás után *EcoRV* restriktációs enzimmel linearizált pBluescript SK+ vektorba klónoztuk. A klónozott fragmentumok szekvenciájának meghatározása a pBluescript SK+ vektor szakaszaira tervezett T3 és T7 primerek segítségével történt. A kapott szekvenciát összehasonlítottuk és azonosítottuk a NCBI szekvencia-adatbázisban talált adatokkal.

Az így meghatározott *cpa* génszakasz szekvenciájának ismeretében fordított irányú specifikus primereket terveztünk az inverz PCR alkalmazásához. A specifikus inverz primereket a 7. táblázat mutatja be. Az inverz PCR-módszer alkalmas a genomi DNS ismert régióival szomszédosan *upstream* és *downstream* elhelyezkedő, ismeretlen szakaszok felszaporítására (Triglia és mtsai. 1988, Ochman és mtsai. 1988). Az eljárás lényege, hogy a genomi DNS-t feldaraboljuk egy olyan restrikciós enzimmel, ami nem hasít az ismert szekvenciájú szakaszban, majd az emésztett fragmentumokat önmagukkal ligáljuk. Az így keletkezett cirkuláris DNS-darabok egy része tartalmazza a keresett DNS-szakaszt, melyen az ismert szekvencia alapján tervezett, a gén két vége felé irányuló primerpár tagjai a cirkularizáció után már egymás felé néznek, így a primerek közé eső szakasz PCR-rel felszaporítható. Munkánk során számos restrikciós enzimet teszteltünk, de csak a *Bam*HI enzimmel történő restrikciós emésztés után sikerült amplifikációs terméket kapnunk az inverz PCR esetében CPINV1-CPINV2 primerpárral. A szekvenciaelemzés megerősítette, hogy a felszaporított és klónozott DNS-szakasz a *cpa* gén egy részével egyezik meg. Az így kapott DNS-szakasz 1475 bp méretű fragmentum volt, nem a teljes kódoló szekvencia, ami kb. 2000 bp hosszúságú lehet. Viszont kiderült, hogy a *cpa* gén tartalmaz egy 72 bp nagyságú intront. Az intron, illetve a gén 5' és 3' nem kódoló régiói a gombagének általános jellemzőit mutatják. Az intron tartalmazza az intronok 5' végén általánosan megfigyelhető GT, míg 3' végén az AG motívumokat (Ballance 1990). Munkánkkal párhuzamosan a hollandiai Wageningen egyetem genetikai laboratóriuma ugyanezen *A. niger* CBS.120.49 törzs genom szekvenciáján dolgozott (Herman J. Pel és mtsai. 2007). Tanszékek közti együttműködés révén lehetőségünk volt az általunk kapott szekvenciaadatok és az *A. niger* CBS 120.49 törzs megszekvenált genomjának összehasonlítására. Így további inverz PCR-ek nélkül megismerhettük a teljes kódoló génszakasz, illetve a promóter és terminális részek szekvenciáit.

Az *A. niger cpa* gént kódoló régió 3287 bp hosszúságú, a kódoló szakasz hossza 1939 bp, amely egy 72 bp intront tartalmaz és egy 621 aminosavból álló fehérjét határoz meg (14. ábra). Az intron viszonylag rövid (72 bp), a fonalgombáknak megfelelően. A promóter régió 648 bp hosszúságú, amely nem tartalmaz TATA motívumot upstream helyzetben a startkodontól. Ez az AT-gazdag motívum ritka sajátosság a fonalgomba-promóterekben, de jelen lehet a startkodontól *upstream* helyzetben 30-60 bázispárnyira. Jelenléte nem szükséges a génexpresszióhoz (Hamer és Timberlake, 1987). Ezenkívül a promóterben több CAAT-motívumot is találtunk 26 bp illetve 203-640 bp távolságnyra, és a startkodontól *upstream* 183 bp-nyira jellegzetes pirimidingazdag régiót azonosítottunk.

ccatc**caat**gcgggcatccattcgatgtttctccaaacttcgattatagctgcattcgccctgcgcgacttag 72
 cctaatacat**caat**cggtgggccttttaagtattagactaaactcgtgtccagctcgtgggtgcgcagacacca 144
 tacctcggtatctctatcactgcctgttcagccttgtgttgagcaccggcacactttcttcgatgctatgtc 216
 ccagccatataagggt**caat**ctccgactcaagtgacagaatcagctatacaggttcactgcttcttatat 288
 agtacatgaggatt**caat**aaagccaagttcagcagagctcttggtccagagcttgaatactcggttagcattc 360
 cagggatgtggggaga**caat**ccaggagcagcagccatcatttgggtgcctgaggcacacagcactgcctcgt 432
 ctccactcc**caat**acttaccaagtcacccacca**ttccttccctcttttcggcctttctctttctctctctc**ac 504
 ttctgctctcgtgcaccactttttctccactcacgccatccttctccatccatttctgcacaaacttttgt 576
 ctgtcatttttaggtttttgaaggagatgactcgggtgactactctt**caat**cccggcgctactcaacatccata 648
 M R H L L S L L V L L I A S A A L 17
 ATG CGT CAC CTC TTA TCA CTG CTG GTG CTT CTG ATC GCA TCG GCC GCC CTG 700
 V S A V P A G S I I T P Q P P V E P 35
 GTC TCC GCC GTC CCC GCC GGC TCC ATT ACT CCA CAA CCA CCC GTC GAG CCC 754
 V H L L S S S Q P S D P R R P W I R L 53
 GTT CAC CTT CTC TCT TCC CAG CCC TCT GAT CCC CGA AGG CCA TGG ATC CGC CTC 808
 R D W I I E S I W G I E K P A S R R 71
 CGT GAC TGG ATC ATC GAG TCC ATA TGG GGC ATC GAA AAA CCC GCA TCT CGT CGA 862
 F P L N D S P R N R S P P S R I L A 89
 TTC CCA CTC AAC GAT TCC CCG CGC AAT CGC TCT CCT CCC TCC CGG ATT CTG GCG 916
 R Y G S D V V L R F S L R N H D E A 107
 CGC TAC GGT AGT GAC GTC GTA CTT CGT TTC AGC CTG CGC AAT CAC GAT GAG GCC 970
 E A L A Q A A D I L F L D V W A S T 125
 GAG GCA TTG GCC CAG GCT GCA GAC ATT CTA TTC CTG GAC GTA TGG GCG TCT ACT 1024
 P A F V D I R L A E E V 137
 CCA GCA TTC GTA GAT ATC CGA CTG GCC GAG GAA GTC **gtaagtgggtcatccttcgctcc** 1083
 I P S L L G 143
 atatctgcccgggtgactgatgcctgatccactgtgaccctcgcaac**ag**ATT CCC TCA TTA TTG GGC 1150
 L L P N S L Q T A Y T P L I D N L A 161
 TTG CTA CCA AAT TCC CTC CAG ACC GCA TAT ACT CCC CTA ATA GAC AAC CTG GCA 1204
 E R I Y T T Y P S K K P I G L E G Q 179
 GAG AGA ATC TAT ACG ACC TAT CCA TCT AAA AAG CCG ATA GGA CTT GAA GGA CAA 1258
 S G F A S S S R P A P K F G D L F F 197
 TCT GGA TTT GCG TCC TCG AGT CGA CCT GCG CCA AAG TTC GGT GAC CTT TTT TTC 1312
 H E Y Q P L S V I I P W M R L L A S 215
 CAC GAG TAT CAG CCT TTG TCC GTC ATT ATC CCC TGG ATG CGG CTG CTG GCT TCC 1366
 M F P S H V R M I S V G V S Y E G R 233
 ATG TTT CCA TCC CAT GTG CGC ATG ATT AGC GTT GGA GTA TCT TAC GAG GGT CGC 1420
 E I P A L R L S A G S S T A A S G P 251
 GAA ATT CCC GCC CTC CGA CTG AGC GCA GGC AGC TCC ACC GCG GCG TCA GGC CCT 1474
 R K T I I V T G G S H A R E W I G T 269
 CGT AAA ACA ATC ATC GTT ACG GGT GGT AGC CAT GCC CGC GAA TGG ATT GGC ACC 1528
 S T V N H V M Y T L I T K Y G K S K 287
 TCA ACC GTG AAC CAT GTA ATG TAC ACG CTC ATT ACC AAG TAT GGC AAA TCC AAG 1582
 A V T R L L Q D F D W I M I P T I N 305
 GCC GTT ACC CGC CTT CTA CAG GAC TTC GAC TGG ATC ATG ATC CCC ACG ATC AAT 1636
 P D G Y V Y T W E T D R L W R K N R 323
 CCC GAC GGC TAT GTT TAT ACC TGG GAG ACG GAC CGA CTA TGG CGC AAG AAT CGA 1690
 Q R T S L R F C P G I D L D R A W G 341
 CAG CGG ACC AGC CTA CGC TTC TGT CCC GGA ATC GAT CTT GAC CGC GCC TGG GGC 1744
 F E W D G G R T R A N P C S E N Y A 359
 TTC GAA TGG GAC GGC GGT CGG ACC CGC GCT AAC CCT TGT TCA GAA AAC TAT GCT 1798
 G D E P F E G M E A Q Q L A Q W A L 377
 GGA GAC GAG CCC TTC GAG GGA ATG GAA GCA CAA CAA TTA GCA CAG TGG GCG CTC 1852
 N E T Q N N A D I V S F L D L H S 395
 AAC GAG ACA CAA AAC AAT GCC GAC ATC GTG AGC TTC GAT CTT GAC CTT CAC TCT 1906
 Y S Q T I L Y P F S Y S C S S I P P 413
 TAC TCT CAA ACA ATT CTC TAC CCC TTC TCC TAC TCC TGC TCC TCG ATC CCT CCA 1960
 T L E S L E L G L G L A K A I R Y 431
 ACG CTC GAG AGC CTG GAA GAG CTA GGC CTT GGC CTA GCC AAG GCC ATT CGG TAC 2014
 A T H E I Y D V T S A C E G I V T A 449
 GCG ACT CAC GAA ATC TAC GAT GTC ACT TCT GCC TGC GAA GGC ATC GTC ACG GCC 2068
 S A A D N N P G R F F P I G G N S G 467
 AGT GCG GCA GAT AAC AAC CCC GGG CGG TTC TTC CCC ATT GGT GGC AAC TCC GGT 2122
 G S A L D W F Y H Q V H A T Y S Y Q 485
 GGC AGT GCG TTG GAC TGG TTT TAC CAC CAA GTG CAC GCG ACT TAT TCA TAC CAG 2176
 I K L R D R G S Y G F L L P S E H I 503
 ATC AAG CTT CGT GAT CGC GGA AGC TAC GGG TTC CTC CTT CCG TCT GAA CAC ATC 2230
 I P T G K E I Y N V V L K L G S F L 521
 ATC CCC ACC GGC AAG GAG ATC TAC AAT GTT GTT CTG AAA TTG GGA TCC TTC CTC 2284
 I G G D S F D V D W E S E L F D L S 539
 ATC GGA GGC GAC TCA TTT GAC GTC GAT TGG GAA TCA GAA CTC TTC GAT CTG TCA 2338
 K D E S D L D S R Y S K S N D R S P 557
 AAG GAC GAA TCC GAT CTG GAT AGC CGC TAT TCA AAA TCC AAT GAC CGC TCC CCG 2392
 A Y L H N A N G P L P N I D E D E D 575

```

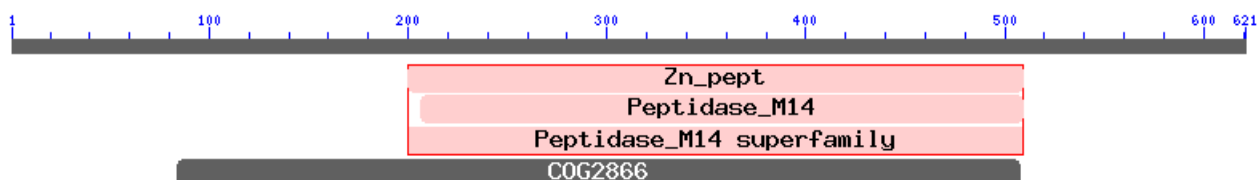
GCG TAT CTA CAC AAC GCC AAC GGC CCC CTG CCC AAC ATT GAC GAA GAC GAA GAT 2446
K E W V M V E E E D Y T D D D D D D 593
AAG GAA TGG GTA ATG GTG GAG GAA GAA GAC TAC ACA GAC GAT GAC GAC GAT 2500
D D D D E E E E E E E E D T Y W A T 611
GAT GAT GAT GAT GAA GAA GAG GAA GAG GAA GAG GAA GAT ACA TAT TGG GCC ACC 2554
E H T Y E F R R R R R * 621
GAA CAC ACA TAC GAA TTT CGG CGA CGA CGC TGA 2587
tgatggacaaactaatcaaccctatttatatgacaccctcgcccatatactctccttctgatgacgatcaat 2659
aatgactaatgacgggtttgcgggagtgattgacgtgtttatcatgctctgcttctcgtattccttttattat 2731
tttagatactgttcccttcagggtgcctatagcctatagagcttaggggtattctctacataaattaaatacag 2803
agtaattcaatgaatcgctcctatcaaataatggaccgagtaactaactgggtgttccattccttcctgactg 2875
tacttaatctgtaaggaattgaaagctaagcctcataagctacttcacccactccttaccaggtgcagtg 2947
tatcatgatcatcgtcatacatcattcgttaggtatctttccgatgcatgtacataaacctccgccccggc 3019
aatttctagataaaccttagcgcaagaacatcccccatctaagggtgaatcttcgcatccccgcagccgagca 3091
gcagaatcaagggaagaaagaaagaaagactgaaaaaaaagatggaaaactagaacaaccacgcccaca 3163
aacttccgataaaaccacccggctttcccatcgtctcctcctgaaagcctccgcccagataatactcctcc 3235
tccatccgatccacgacatccttgcccgtaacagatccgcctcgtaaggac 3287

```

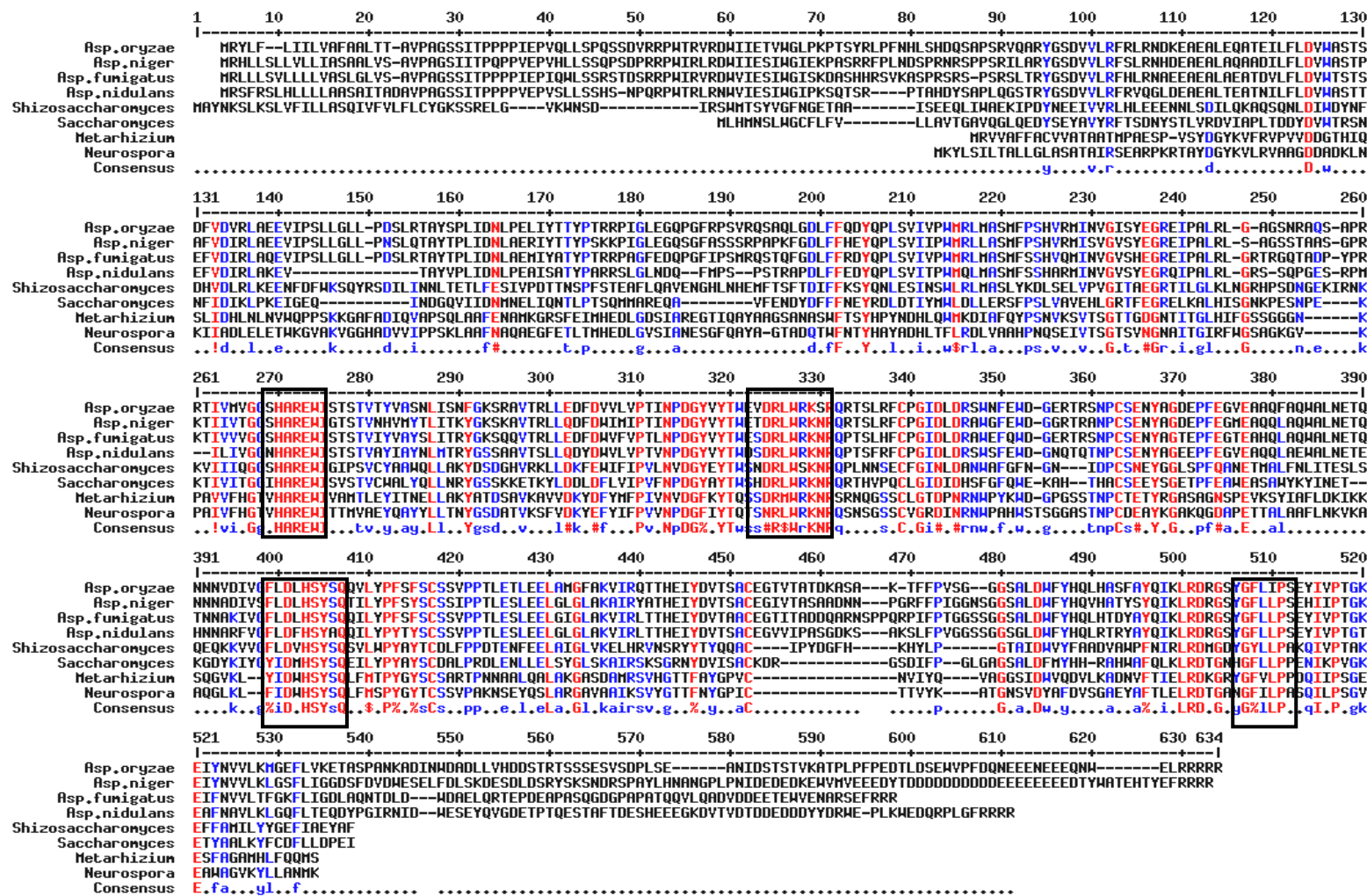
14. ábra: Az *Aspergillus niger* CBS 120.49 *cpa* génjének teljes nukleotid- és aminosav-szekvenciája. A kék betűk a gén kódoló részét, a zöld kisbetűk az intronokat, míg a piros nagybetűk a tripletek által kódolt aminosavakat jelölik. Az intron 5' és 3' végén található GT és AG motívumokat vastag betűkkel, ill. aláhúzással ábrázoltuk, míg a szabályozó régiókban azonosított jellegzetes szekvenciaprészeket szürke kiemeléssel jelöltük.

A terminális régió 700 bp hosszúságú, ebben 69 bp *downstream* helyzetben azonosítottuk a konszenzus AATAAA poliadenilációs szignálszekvenciát. Ez a szekvencia szinte változatlanul található meg az eukarióta gének 3' régiójában, azonban fonalgombákban – főleg aszkuszos és bazídiumos gombákban – gyakran hiányzik. De ha jelen van, változó távolságra lehet a fő poliadenilációs helytől, illetve a motívum szekvenciája is változhat. A mi esetünkben AATAA a konszenzus szekvencia.

Maga a fehérje 621 aminosavból áll, feltételezhetően egy cink-metalloenzim (15. és 16. ábra). Aminosav-szekvenciája alapján tartalmaz olyan konzervált részeket, mely egy cinkion-kötőhelyre utal. Ebből adódóan a fehérje az M14 peptidázok szupercsaládjába tartozik. (Munkánk elején ezen konzervált részekre tervezett primerek segítségével indultunk el a *cpa* génszekvenciájának elemzése felé.)



15. ábra: A *cpa* génben felelhető konzervált domének aminosav-szekvencia alapján. Négy domén van feltüntetve az ábrán, ebből 3 pirossal jelölt utal arra, hogy ez a fehérje egy cink-metalloenzim. A 4. szürkével jelölt domén pedig, hogy egy feltételezett karboxipeptidáz, mely az aminosav-transzportban és metabolizmusban vesz részt.



16. ábra: Az *Aspergillus niger* cpa aminosav-szekvenciájának összehasonlítása más gomba (metallo)karboxipeptidáz aminosav-szekvenciákkal. Az ábrán feketével bekeretezett részek a konzervált domének, melyek arra utalnak, hogy az enzim rendelkezik egy cinkion-kötőhellyel. Ezen kívül a piros betűvel jelzett részek szintén erősen konzervált részekre utalnak.

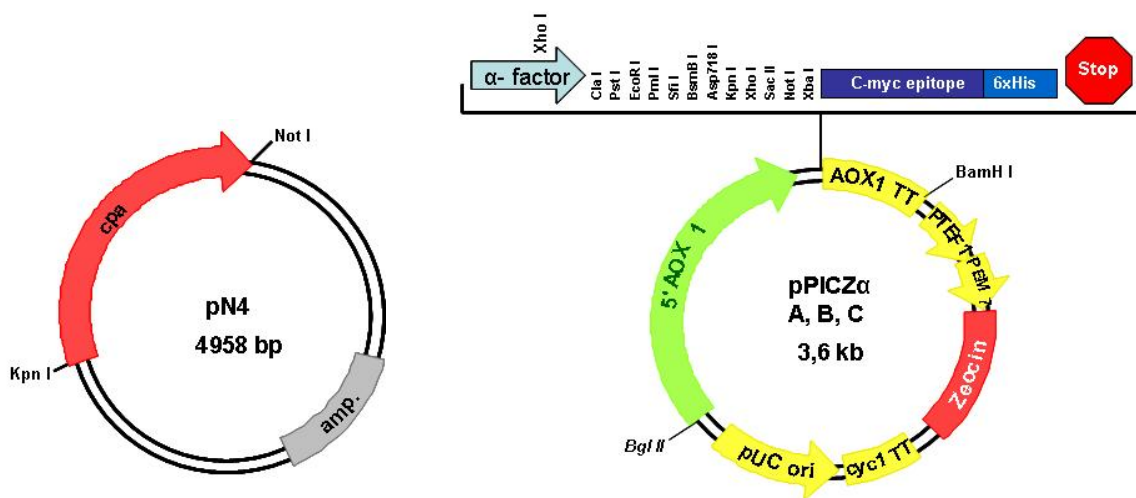
6./4. A *cpa* gén expressziója *Pichia pastoris* transzformációs rendszerben.

6./4.1. A *cpa* gén vektorba történő beillesztése.

Terveink között szerepelt a karboxipeptidáz A-t kódoló gén expresszáltatása *Pichia pastoris* transzformációs rendszerben, amely eljárás alkalmazható lenne a fehérje nagyobb mennyiségben történő termelésére. Ezen kísérletekkel szeretnénk volna alátámasztani az alaphipotézisünket, hogy ez az enzim lehet felelős az OTA bontásáért. Ha bebizonyosodik, hogy ez a fehérje vesz részt az OTA lebontásában az *A. niger* CBS 120.49 törzs esetében, akkor felhasználható lenne olyan biológiai dekontaminációs eljárásban, mely esetlegesen kedvezőbb, mint a kémiai dekontaminációs eljárások.

Kísérleteinket először a *cpa* gént tartalmazó (pN4) vektor megtervezésével és elkészítésével kezdtük el. Elsőként a meglévő *cpa* génszekvencia alapján specifikus primereket terveztünk (7. táblázat) a teljes kódoló rész izolálásához, melyet több lépésben hajtottunk végre. A CPAV1 primer 5' végére egy *KpnI*, a CPAV4/a primer 5' végére pedig egy *NotI* restrikciós hasítóhelyet terveztünk. Erre azért volt szükség, hogy majd a meglévő teljes szekvenciát át tudjuk helyezni a pPICZα (A) vektorba a *KpnI* és *NotI* restrikciós enzimek segítségével. Első lépésként a CPAV1–CPAV2 specifikus primerpárral amplifikált 1105 bp nagyságú, tompa végű fragmentumot *Sma I* restrikciós enzimmel emésztett (szintén tompa végű) pSK(+) plazmidba ligáltuk (1.vektor). Ez az 1105 bp nagyságú fragmentum a *cpa* gén 1-1105. bp közötti szakaszának felel meg. Következő lépésként az ORCPA2–CPAR2 degenerált primerpárral kapott 1450 bp nagyságú tompa végű fragmentumot *EcoR V* restrikciós enzimmel emésztett (szintén tompa végű) pSK(+) plazmidba ligáltuk (2.vektor). Ez az 1450 bp nagyságú fragmentum a *cpa* gén 164-1612 bp-nak felel meg. Harmadik lépésként a CPAV3–CPAV4/a specifikus primerpárral kapott 895 bp nagyságú tompa végű fragmentumot *EcoR V* restrikciós enzimmel emésztett (szintén tompa végű) pTZ57R plazmidba ligáltuk (3.vektor). Ez a 895 bp nagyságú fragmentum a *cpa* gén 1043-1939. bp közötti szakaszának felel meg. Ezután az 1. és a 2. vektort *Pst I* és *Apa I* restrikciós enzimekkel emésztettük és az emésztés során kapott fragmentumok közül az 1. vektorból származó 3239 bp nagyságú és a 2. vektorból származó 1316 bp nagyságú fragmentumokat ligáltuk. Az így kapott vektor a *cpa* gén 1612 bp nagyságú fragmentumát tartalmazta. Ezt az új vektort és a 3. vektort *Hind III* és *Apa I* restrikciós enzimekkel emésztettük. A kettős emésztés során kapott fragmentumok közül az 1. + 2. vektor keverékéből származó 4432 bp nagyságú és a 3. vektorból származó 420 bp nagyságú fragmentumokat ligáltuk. Az így kapott vektor (pN4) tartalmazta a *cpa* gén

teljes kódoló részét (1939 bp). A promóter és a terminális régiókra nem volt szükségünk, mivel a pPICZ α (A) vektor már tartalmazott egy AOX1 promótert és terminális régiót. A pN4 vektort és az *EasySelect Pichia Expression Kit*-ből származó pPICZ α (A) vektort *KpnI* és *NotI* restrikciós enzimekkel emésztettük. Az emésztés hatására a pN4 vektorból kivágtuk a *cpa* gént, melyet a felnyitott pPICZ α (A) vektorba ligáltunk. Ezután a *cpa* gént tartalmazó pPICZ α (A) vektort *Pichia pastoris* élesztősejtekbe transzformáltuk és expresszáltattuk az *EasySelect Pichia Expression Kit* utasításainak megfelelően.

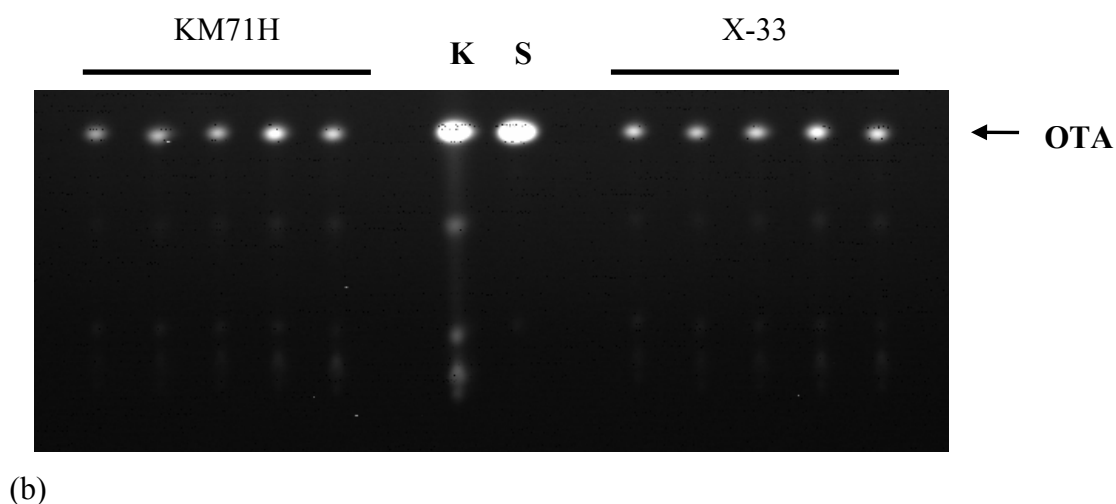
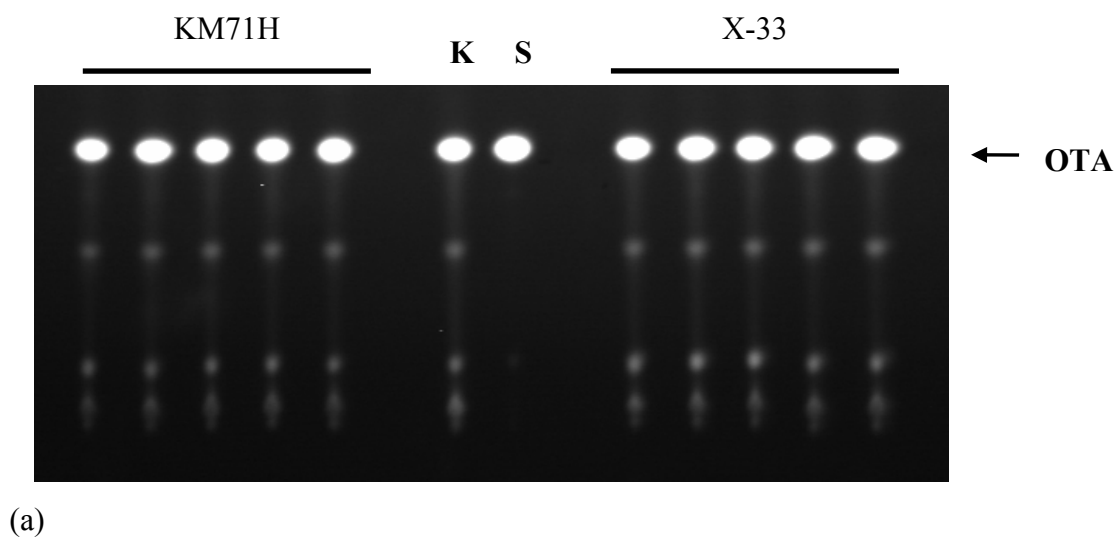


17. ábra: A *cpa* gén teljes kódoló részét tartalmazó vektor (pN4) és a pPICZ α vektor képe. A piros nyíllal jelzett részt helyeztük át a pPICZ α vektorba, *KpnI* és *NotI* restrikciós enzimmel történő hasítás után.

6./4.2. A nem transzformáns *Pichia pastoris* KM71H és X-33 (vad típus) törzsek tesztelése ochratoxin A-bontásra.

Mielőtt megkezdtük volna a *Pichia pastoris* KM71H törzset transzformálni a CPA gént tartalmazó pPICZ α -A vektorral, elvégeztünk az *EasySelect Pichia Expression Kit*-ben található KM71H és X-33 törzsekkel egy kísérletet, hogy képesek-e az OTA-bontásra és adszorpcióra. A kontroll kísérletből kiderült, hogy a tápoldat extrakcióban megjelent a hozzáadott OTA-mennyiség jelentős része, vagyis a két vizsgált izolátum nem képes lebontani az OTA-t. Viszont a sejtextrakcióban is megjelent kis mennyiségben az OTA, ami azt mutatja, hogy a sejtek képesek az OTA kismértékű adszorpciójára (18. ábra). A

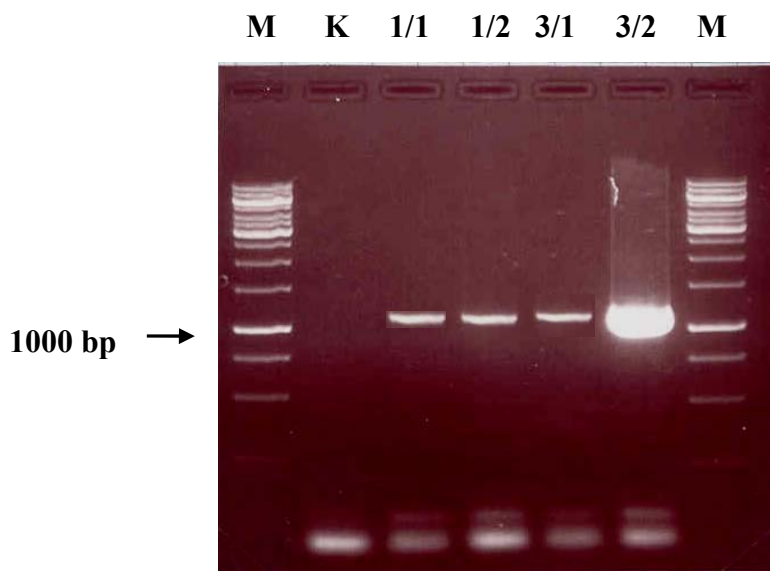
későbbiekben megpróbáltuk úgy tervezni a kísérleteket, hogy a *Pichia pastoris* KM71H törzs adszorpciós képessége ne vezessen félre bennünket (a sejtek és a fermentlé szétválasztásával).



18. ábra: Ochratoxin A-bontás ellenőrzésének vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) képe *Pichia pastoris* KM71H és X-33 törzsek esetében. **(a)** Tápoldat-extrakció: balra az 1-5. folt a naponkénti mintavételeket jelenti KM71H izolátum esetében, jobbra a 8-12. folt a naponkénti mintavételeket jelenti X-33 izolátum esetében. **S:** standard ochratoxin A (2 µg), **K:** kontroll minta, ami csak a hozzáadott ochratoxin A-t tartalmazta. **(b)** Sejtexttrakció: balra az 1-5. folt a naponkénti mintavételeket jelenti KM71H izolátum esetében, jobbra a 8-12. folt a naponkénti mintavételeket jelenti X-33 izolátum esetében. **S:** standard ochratoxin A (2 µg), **K:** kontroll minta, ami csak a hozzáadott ochratoxin A-t tartalmazta.

6./4.3. *Pichia pastoris* transzformáns izolátumok (KM71H: 1/1, 1/2, 3/1, 3/2) tesztelése ochratoxin A-bontásra.

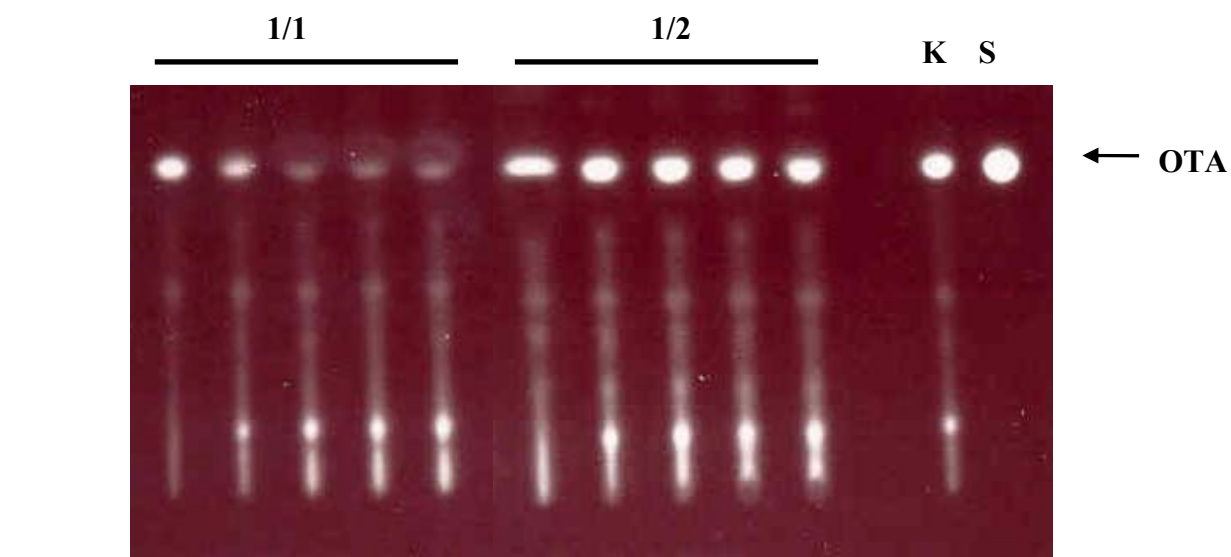
Az *EasySelect Pichia Expression Kit*-nek megfelelően elvégeztük a *Pichia pastoris* KM71H izolátum transzformálását a *cpa* gént tartalmazó pPICZ α -A vektorral. Azért ezt a vektortípust választottuk, mivel a pPICZ α -A vektor alkalmas arra, hogy a kívánt fehérjetermék majd szekretálódjon az élesztősejtből. Ezen túl a C-terminális polihisztidin végnek köszönhetően a későbbiekben lehetőség lesz a rekombináns fúziós fehérjét oszlopon tisztítani. Ezt követően fel lehet használni további vizsgálatokhoz. A transzformálást követően 4 izolátum bizonyult megfelelőnek, ezekből DNS-izolálást végeztünk annak megállapítására, hogy valóban sikeres volt-e a transzformálás. A DNS-izolálást követően a *cpa* génre tervezett CPAV1 – CPAV2 primerpárral és már korábban alkalmazott paraméterekkel PCR-t mértünk össze ellenőrzés céljából. A várt PCR termék mérete 1096 bp. A PCR-ből kiderült, hogy mind a négy transzformáns izolátum megfelelő a további kísérletekhez (19. ábra).



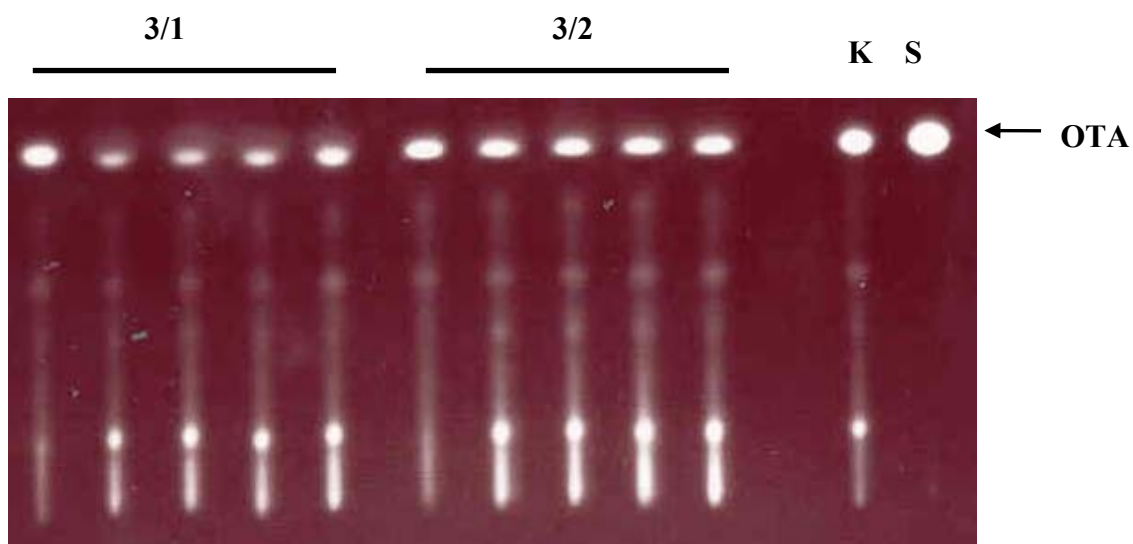
19. ábra: A *Pichia pastoris* transzformánsok (1/1, 1/2, 3/1, 3/2) CPAV1-CPAV2 primerpárral történő ellenőrzésének gélelektroforetikus képe. Marker: 1kb DNA ladder (Fermentas), K: negatív kontroll.

Ez követően mind a négy rekombináns izolátummal (1/1, 1/2, 3/1, 3/2) elvégeztük az expresszálatást az *EasySelect Pichia Expression Kit* leírásának megfelelően. A kísérleti folyamat alatt az 1., 4. és 7. napon vettünk mintát a fehérje kimutatásához. Ezt a 7 napot

követően az *Pichia* élesztősejteket elválasztottuk a fermentlétől, amire azért volt szükség, hogy a későbbiekben az élesztősejtek OTA-adszorpciós képessége ne zavarja meg a OTA-bontás kiértékelését. Az expresszáltatást követően a sejtmentes (natúr) fermentlé elméletileg tartalmazza az OTA bontásért felelős enzimet. A natúr fermentléhez OTA-tadtunk, melyet 30°C-on 5 napig inkubáltuk és naponta mintát vettünk az OTA-extrakcióhoz.



(a)



(b)

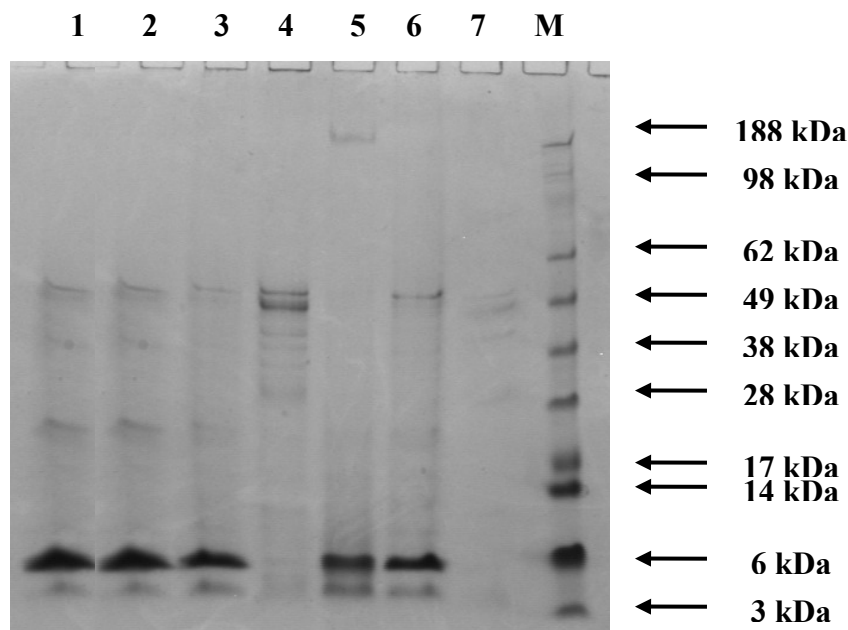
20. ábra: Ochratoxin A-bontás ellenőrzésének vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) képe transzformáns *Pichia pastoris* törzsek esetében. **(a):** 1/1 és 1/2 *Pichia* transzformáns izolátumok fermentlevének extraktuma (napenkénti mintavétel). **(b):** 3/1 és 3/2 *Pichia* transzformáns izolátumok fermentlevének extraktuma (napenkénti mintavétel). **S:** standard OTA (2 µg), **K:** kontroll minta, OTA-expresszáltató tápoldatban.

A vékonyréteg-kromatogrammok (TLC) kiértékeléséből kiderült, hogy csak az 1/1 és 3/1 transzformáns *Pichia* izolátumok esetében volt kismértékű csökkenés az OTA-mennyiségből (20. ábra). Mindkét esetben a 2. illetve a 3. naptól fogva kezdett csökkenni az OTA-mennyiség.

Az 1/1 és 3/1 transzformáns *Pichia* izolátumok expresszáltatása során vett fermentlé-mintákból (1., 4. és 7. napos minta), melyek nem tartalmaztak élesztősejteket, fehérjekivonatot készítettünk, majd ezt követően megfutattuk fehérje-gélelektroforézissel (22. ábra). Mielőtt kiértékeljük volna a fehérje-gélelektroforézis eredményét, megbecsültük a várt fehérjénk méretét a BioEdit programba bevitt aminosav-szekvencia segítségével. A program által kapott eredmény szerint a várt fehérje mérete körülbelül 70 kDalton lehet (21. ábra).

Protein: cpa			
Length = 621 amino acids			
Molecular Weight = 70037,16 Daltons			
Amino Acid	Number	Mol%	
Ala A	45	7,25	
Cys C	4	0,64	
Asp D	47	7,57	
Glu E	46	7,41	
Phe F	23	3,70	
Gly G	38	6,12	
His H	14	2,25	
Ile I	40	6,44	
Lys K	16	2,58	
Leu L	60	9,66	
Met M	8	1,29	
Asn N	22	3,54	
Pro P	41	6,60	
Gln Q	15	2,42	
Arg R	41	6,60	
Ser S	60	9,66	
Thr T	31	4,99	
Val V	28	4,51	
Trp W	16	2,58	
Tyr Y	26	4,19	

21. ábra: A *cpa* fehérje méretének meghatározása aminosav-szekvencia alapján, BioEdit program segítségével.



22. ábra: A 1/1 és 3/1 transzformáns *Pichia* izolátumok fermentlevéből kivont fehérjeextraktum fehérje-gélelektroforetikus képe. Marker: SeeBlue[®] Plus 2 lot. SBS 41129 (10 µl, Invitrogen), **1-3:** 3/1 izolátum fermentlevéből kivont fehérjeextraktum (sorendben: 7., 4. és 1. nap), **4-6:** 1/1 izolátum fermentlevéből kivont fehérjeextraktum (sorendben: 7., 4. és 1. nap), **7:** nem transzformáns KM71H izolátum fermentlevéből kivont fehérjeextraktum (7. nap, kontroll).

Összehasonlítva a program által megadott, és a fehérje-gélelektrofórézis során kapott eredményeket, nem kaptunk körülbelül 70 kDalton méretű terméket. Ezen felül összehasonlítottuk a kontroll mintánkat a natúr fermentlé fehérjekivonatával. Észrevehetően megjelentek más méretű termékek, melyek nincsenek jelen a kontroll minta fehérjekivonatában. Feltehetően nem juthatott ki a *cpa* fehérjénk a sejtből, vagy esetleg olyan alacsony mennyiségben volt jelen a fehérjetermékünk, hogy nem adott jelet a fehérje-gélelektrofórézis során. További kísérleteket tervezünk, hogy bizonyítani tudjuk hipotézisünket, miszerint az *A. niger* (CBS 120.49/N400) karboxipeptidáz enzime lehet felelős az OTA bontásáért.

6./5. *Aspergillus* fajok pANCPA vektorral történő transzformálása

Alaphipotézisünket, mely szerint egy karboxipeptidáz enzim lehet felelős az OTA bontásáért, egy másik kísérletsorozattal is szeretnénk volna alátámasztani. Előző kísérleteinkkel párhuzamosan megkezdtük az *A. niger* CBS 120.49/N400 törzs *cpa* enzimfehérje génjét összeépíteni egy olyan vektorba, mellyel transzformálni lehet más atoxinogén *Aspergillus* fajokat. Három *Aspergillus* törzset (*A. niger* JHC 607, *A. nidulans* SZMC 0552/WT0307 és *A. fumigatus* NRRL 5587/52) választottunk ki a transzformációs kísérletekhez. Ezek a törzsek atoxinogén *Aspergillus* fajokba tartoznak.

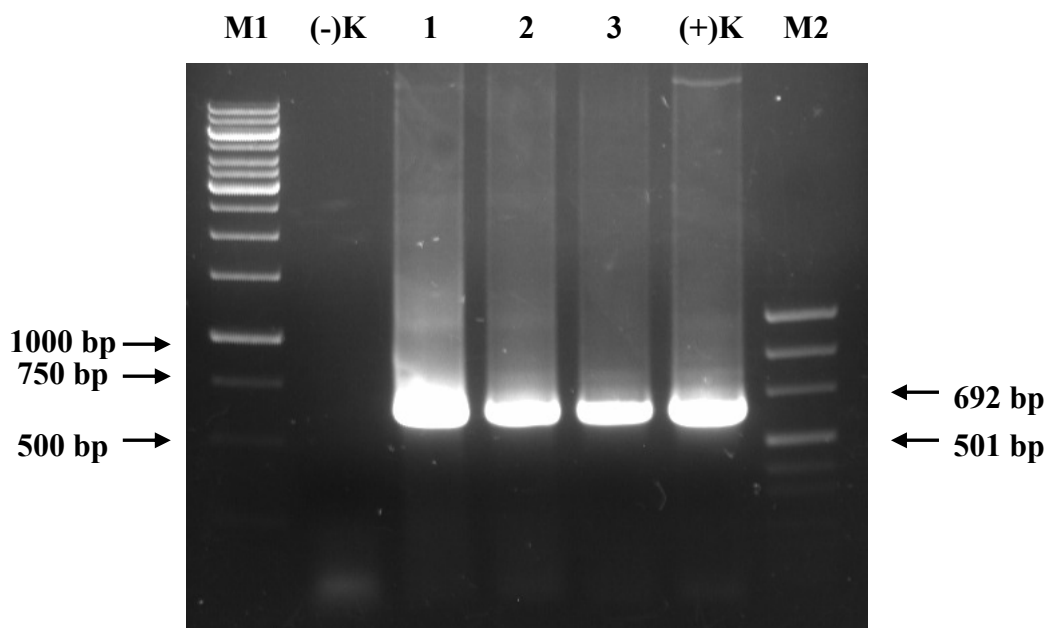
6./5.1. A pANCPA vektor elkészítése

Kísérleteinket először a *cpa* gént tartalmazó (pANCPA) vektor megtervezésével és elkészítésével kezdtük el. A transzformációs kísérletek során kapott telepek szelekciójához szelekciós markerként a hygromicin B-rezisztenciagént használtuk fel. A vektor megtervezésekor az volt az elgondolásunk, hogy a *cpa* enzimfehérjét kódoló gént saját promótere és terminális régiója nélkül fogjuk felhasználni, mivel ezen részek funkcionális gyakoriságáról nem rendelkezünk információval. Elképzelésünk az volt, hogy az irodalmi adatokból már ismert *A. nidulans*-ból származó *trpC* gén promóterét és terminális régióját alkalmazzuk (John E. Hamer és mtsai. 1987). A szelekciós marker (hygromicin B^R) génje is ezen részekkel irányított.

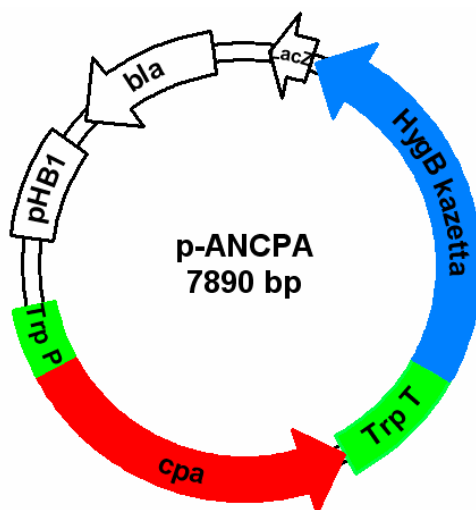
A vektor elkészítésekor az első lépésekhez a pCSN43 vektort alkalmaztuk, melyben megtalálható a számunkra fontos *trpC* gén promótere és terminális régiója, ezen kívül a *hygB^R* gén is. **1. lépés:** A pCSN43 vektorból *SalI* és *EcoRI* restrikciós enzimekkel kivágtuk a *trpC* gén promóterét, melyet áthelyeztünk egy pGEM-T easy vektorba, amit szintén ezekkel a restrikciós enzimekkel nyitottunk fel. **2. lépés:** A pGEM-T easy vektort *NdeI* és *ClaI* restrikciós enzimekkel hasítottuk, az emésztés során kapott 372 bázispárnyi rész (ez tartalmazta a *trpC* promótert) végeit feltöltöttük Klenow fragment (*DNA Polymerase I large fragment*) és dNTP mix segítségével, hogy tompa végeket (*blunt end*) kapjunk, majd áthelyeztük egy *EcoRI* restrikciós enzimmel hasított pUC18 vektorba. Ezen vektor *EcoRI* restrikciós enzimmel hasított végei is fel voltak töltve Klenow fragment és dNTP mix segítségével. Az eddigi lépéseket kék-fehér színszelekción és restrikciós emésztésen kívül plazmidszekvenálással is ellenőriztük. **3. lépés:** A *trpC* terminális részt *BamHI* és *XbaI* restrikciós enzimekkel kihasítottuk a pCSN43 vektorból, majd áthelyeztük a *trpC* promótert már tartalmazó pUC18 vektorba, ami szintén ezekkel a restrikciós enzimekkel volt felnyitva. Ezen lépés sikerességét szintén alátámasztottuk plazmidszekvenálással is. **4.**

lépés: A pTZ57R vektort, mely a *cpa* kódoló génszakaszt (promóter és terminális régió nélkül) tartalmazta, *Xba*I restrikciós enzimmal hasítottuk, majd a végeket feltöltöttük Klenow fragment és dNTP mix segítségével. A feltöltést követően a mintánkat *Kpn*I restrikciós enzimmal hasítottuk, és a kapott 1952 bp termék már csak a *cpa* kódoló részt tartalmazta. Ezt a szakaszt ligáltuk a 3. lépésben kapott pUC18 vektorral (mely már tartalmazta a *trpC* promóter és terminális részeket), ami *Kpn*I és *Sma*I restrikciós enzimekkel volt felnyitva. Így a *cpa* gént kódoló része pont a promóter és a terminális régió közé került. A 4. lépés eredményességét restrikciós emésztéssel és plazmidszekvenálással ellenőriztük. **5. lépés:** A pCSN43 vektorban lévő hygromicin B rezisztenciagént tartalmazó kazettát (*trpC* promóter, *hygB^R* gén, *trpC* terminális régió) *Sal*I restrikciós enzimmal kivágtuk és áthelyeztük egy *Sal*I restrikciós enzim által hasított pSK(+) vektorba. Ezzel a célunk az volt, hogy megfelelő restrikciós hasítóhellyel rendelkezünk a *hygB^R* gént tartalmazó kazetta *cpa* gént tartalmazó pUC18 vektorba történő áthelyezéséhez. Mivel a hygromicin B rezisztencia gént tartalmazó kazetta kétféle orientációval épülhet be pSK(+) vektorba, így a nekünk megfelelő vektort restrikciós emésztéssel ellenőriztük le. **6. lépés:** A pSK(+) vektorból a *hygB^R* gént tartalmazó kazettát *Xba*I restrikciós enzimmal vágtuk ki és ligáltuk szintén *Xba*I restrikciós enzimmal hasított *cpa* gént tartalmazó pUC18 vektorral. Hogy valóban sikeres volt-e a *hygB^R* gént tartalmazó kazetta beépítése, ezt *hygB^R* génre tervezett NYhph3 és NYhph4 primerekkel végrehajtott PCR során ellenőriztük (7. táblázat, 23. ábra). Az így kapott vektorban (7890 bázispár) már megvolt a *cpa* gén *trpC* promóterrel és terminális régióval és a *hygB^R* gént tartalmazó kazetta (24. ábra).

A pANCPA vektort lineáris formában használtuk fel az *Aspergillus* transzformációs kísérletekhez. Célunk az volt, hogy a *cpa* gén és a *hygB^R* gén homológ rekombináció révén integrálódjon a transzformálni kívánt *Aspergillus* genomba, hogy ezáltal hipotézisünk alátámasztása céljából meg tudjuk vizsgálni, hogy a transzformáns *Aspergillus* törzseknél kapunk-e valamilyen pozitív eredményt az OTA-bontó képességre nézve.



23. ábra: A *hygB^R* gént tartalmazó kazetta NYhph3 és NYhph4 primerekkel történő ellenőrzésének gélelektroforetikus képe pANCPA vektorok esetében. **M1:** 1kb DNA ladder (Fermentas), **M2:** pUC mix marker (Fermentas), **(-)K:** negatív kontroll, mely nem tartalmazott plazmid DNS-t, **1-3:** pANCPA vektorok, **(+)K:** pCSN43 vektor, mint pozitív kontroll. A várt PCR-termék mérete 620 bázispár volt.



24. ábra: Az *Aspergillus* transzformációs kísérletekhez felhasznált pANCPA vektor térképe. A piros nyíllal jelzett rész a *cpa* gént, a zöld részek a *cpa* gén irányításához szükséges *trpC* promótert és terminális régiót, a kék nyíllal jelzett rész pedig a *hygB^R* gént tartalmazó kazettát jelöli. pHB1: replikációs origó, bla: ampicillin-rezisztencia gén, LacZ: β -galaktozidáz N-terminálisát kódoló rész.

6./5.2. Nem transzformáns *Aspergillus* törzsek minimális gátló koncentráció (MIC) értékének meghatározása hygromicin B antibiotikumra nézve

A transzformálás során szelekciós markerként a hygromicin B antibiotikumot alkalmaztuk. A transzformációs kísérlet előtt meghatároztuk a három *Aspergillus* törzs (*A. niger* JHC 607, *A. nidulans* SZMC 0552/WT0307 és *A. fumigatus* NRRL 5587/52) MIC-értékét erre az antibiotikumra nézve. A MIC-érték meghatározását protoplasztokra nézve végeztük el, 8 féle hygromicin B-koncentráció (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 µg/ml) mellett az 5./3.6.3. pontban leírtak alapján (11. táblázat). Az *Aspergillus* törzsek közül legérzékenyebbnek az *A. fumigatus* bizonyult, már 50 µg/ml hygromicin B teljesen gátolta a növekedését. Az *A. nidulans* esetében csak az igen magas 300 µg/ml-es koncentráció gátolta teljesen a növekedését. Egyedül az *A. niger* esetében egyeztek meg az eredmények az irodalmi adatokkal, ami 100-150 µg/ml hygromicin B koncentráció volt (Tilburn és mtsai. 1983; Lakshmi és mtsai. 2004). Ezen adatok alapján terveztük meg a transzformációs kísérleteket.

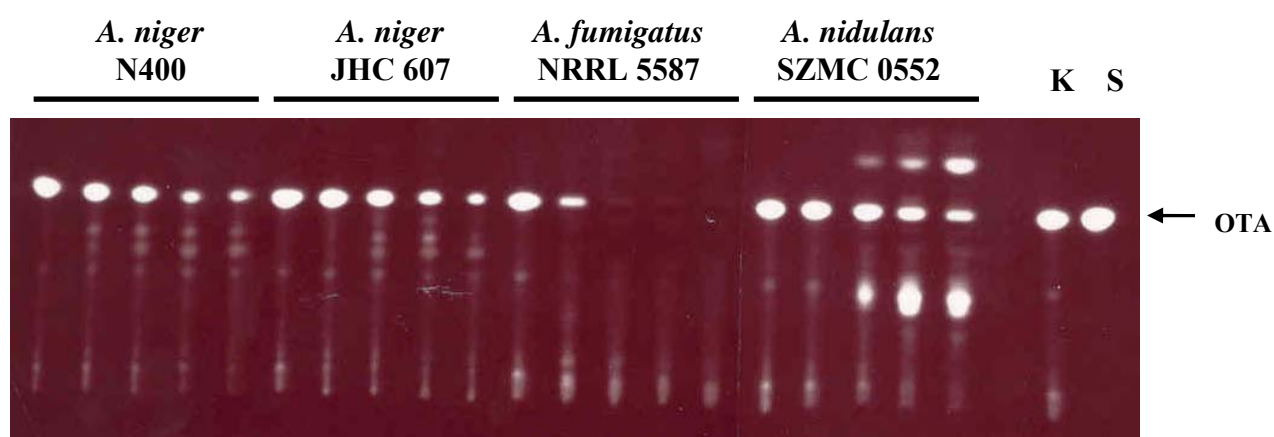
11. táblázat: Nem transzformáns *Aspergillus* törzsek MIC-értékei hygromicin B antibiotikumra nézve. Jelmagyarázat: +++ erőteljes növekedés, ++ közepes növekedés, + gyenge növekedés, - nincs növekedés.

Törzs neve	hygromicin B-koncentráció (µg/ml)							
	0 µg	25 µg	50 µg	75 µg	100 µg	150 µg	200 µg	300 µg
<i>A. niger</i> JHC 607	+++	+++	++	+	+	-	-	-
<i>A. nidulans</i> WT 0307	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-
<i>A. fumigatus</i> 52	+++	+	-	-	-	-	-	-

6./5.3. A kiválasztott *Aspergillus* törzsek transzformálása és tesztelése ochratoxin A-bontásra nézve

Mielőtt elkezdjük volna transzformálni a kiválasztott *Aspergillus* törzseket (*A. niger* JHC 607, *A. nidulans* SZMC 0552/WT0307 és *A. fumigatus* NRRL 5587/52) elvégeztünk egy kísérletet, hogy pozitívnak bizonyulnak-e OTA-bontó képességre nézve, mivel nem lenne célszerű olyan törzset transzformálni a pANCPA vektorral, amely már rendelkezik toxinbontó képességgel. Az *Aspergillus* törzsek közül az *A. fumigatus* törzs pozitívnak

bizonyult OTA-bontásra nézve, már a 3. naptól kezdve jelentősen lecsökkentette az OTA mennyiségét a tápoldatban. Ezen kívül az *A. fumigatus* a leggyakrabban előforduló patogén *Aspergillus* faj. Az aspergillózis során különösen a tüdőt és a melléküregeket árasztja el, de eljuthat más szervekbe is. Ezen kizáró okok miatt vetettük el a további kísérleteket az *A. fumigatus* törzzsel kapcsolatban. A másik két izolátum, az *A. niger* JHC 607 és az *A. nidulans* SZMC 0552/WT0307 nem bizonyult pozitívnak OTA-bontásra nézve, ezekkel a törzsekkel kezdtük el a transzformációs kísérleteket (25. ábra).



25. ábra: Az ochratoxin A-bontó képesség ellenőrzésének vékonyréteg-kromatogrammjá (TLC) a nem transzformáns *Aspergillus* törzsek (*Aspergillus niger* JHC 607, *Aspergillus fumigatus* NRRL 5587/52, *Aspergillus nidulans* SZMC 0552/WT0307) és az ochratoxin A-bontó *Aspergillus niger* CBS 120.49/N400 törzs esetében. **S:** standard ochratoxin A (2 µg), **K:** kontroll minta, ami csak a hozzáadott ochratoxin A-t tartalmazta. Az egy izolátumhoz tartozó 1-5. folt a kétnaponta (1., 3., 5., 7., 9. nap) vett minták extraktumát jelenti.

Az OTA-bontó képesség ellenőrzését követően a transzformációs kísérletek előtt optimalizáltuk a protoplasztáló elegy összetételét, mivel a transzformációs kísérletekhez elég nagy mennyiségű protoplasztra (5×10^7 / ml) volt szükség. Ezen kívül a kiválasztott izolátumok eltérő számú, nagyon alacsony protoplasztmennyiséget (10^4 , 10^5 / ml) produkáltak a kiindulási protoplasztelegyen (0,02 % novozym, 1-2 % csigaenzim). A rendelkezésünkre álló lízisenzimek (*Trichoderma harzianum* lízisenzime, novozym és a tanszék által előállított csigaenzim *Helix aspersa* éticsigafajból) közül, csak a novozym és a tanszéki csigaenzim bizonyult megfelelőnek transzformációs kísérleteinkhez. Az *A. niger* JHC 607 izolátum esetében a lízisenzim összetétele 0,1 % novozym és 1,5 % csigaenzim, míg az *A. nidulans* SZMC 0552/WT0307 izolátum esetében a lízisenzim összetétele 0,02

% novozym és 1,5 % csigaenzim volt. A protoplasztáló elegy beállítását követően irodalmi adatok (Tilburn és mtsai. 1983, Malardier és mtsai. 1989) és az *Aspergillus* (www.aspergillus.org.uk) honlap alapján (ld. 5./3.6.4.) megkezdtek az *A. niger* JHC 607 és az *A. nidulans* SZMC 0552/WT0307 izolátumok pANCPA vektorral történő transzformálását. A transzformációs kísérletek a megállapított MIC-értékek alapján 2-3 transzformáns telepet eredményeztek mindkét törzs esetében, ezeket továbboltottuk megfelelő mennyiségű hygromicin B-t tartalmazó táptalajra (26. ábra), így ellenőriztük, hogy rendelkeznek-e a hygromicin B-rezisztencia markergénjével. Érdekes, hogy a nem-transzformáns *A. nidulans* izolátum még 500 µg/ml hygromicin B-koncentráción is elkezdett növekedni, majd elhaltak a micéliumok (megbarnult telepszélek). Végül egy-egy transzformáns izolátummal rendelkezünk mindkét törzs esetében.



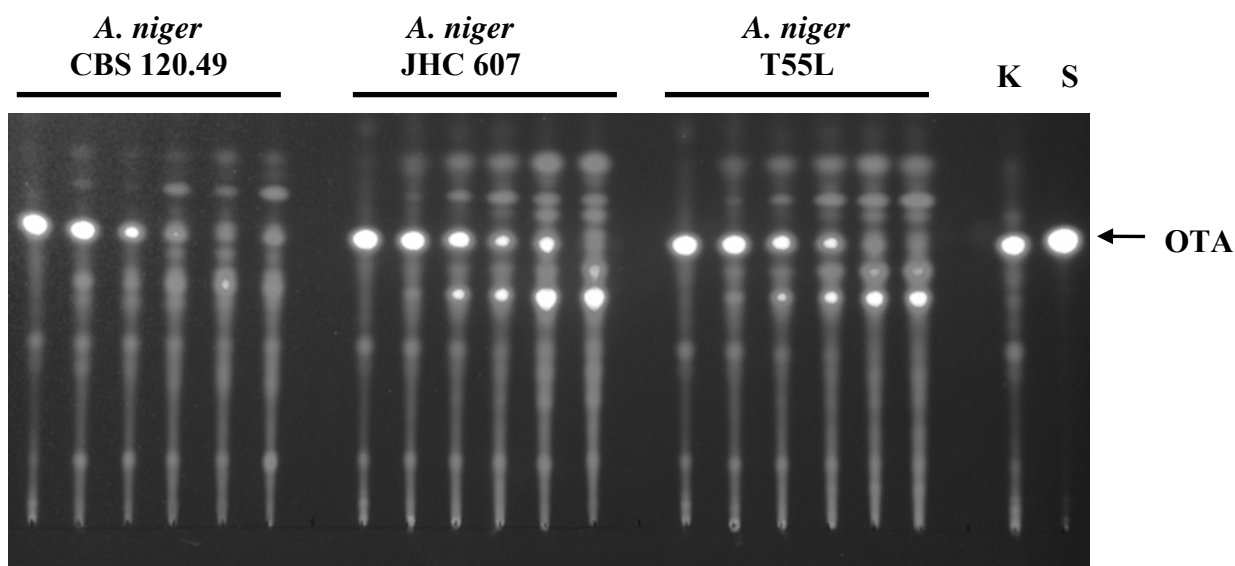
26. ábra: Transzformáns és nem-transzformáns *Aspergillus niger* (JHC607) és *Aspergillus nidulans* (SZMC 0552/WT0307) törzsek minimál (szelektív) táptalajon, 500 µg/ml hygromicin B antibiotikum mellett.

Ezt követően kétféleképpen is ellenőriztük, hogy a transzformáns törzseink rendelkeznek-e a pANCPA vektorral bevitt karboxipeptidáz génnel.

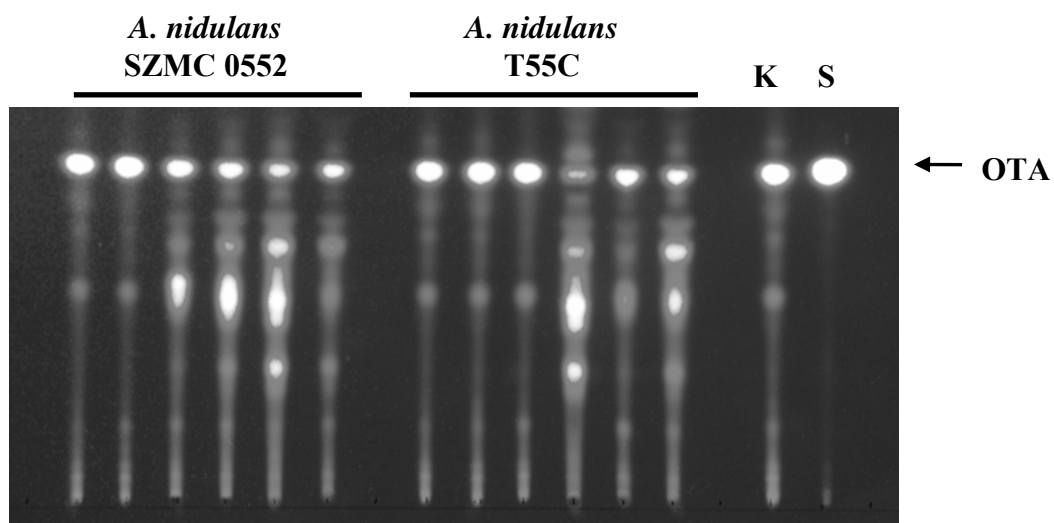
1. Mindkét transzformáns izolátummal (T55L, T55C) elvégeztük az OTA-bontási kinetikát, majd kiértékeljük vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel (TLC). Sajnos a transzformáns *A. nidulans* T55C törzs esetében nem történt semmilyen változás az OTA-bontó képességet illetően (27b. ábra). A transzformáns *A. niger* T55L törzs esetében viszont 2 nappal hamarabb csökkent le az OTA mennyisége a tápoldatban: a 9. nap helyett már a 7. napon jóval kevesebb volt a toxin mennyisége a tápoldatban, de a transzformáns még így sem volt annyira hatékony, mint az *A. niger* CBS 120.49 törzs (27a. ábra).

2. DNS-izolálást végeztünk a transzformáns izolátumokból (T55L, T55C), majd ezt követően elvégeztünk egy PCR-t *A. niger* (CBS 120.49) *cpa* génre specifikus CPAV1-CPAV2 primerpárral annak megállapítására, hogy sikeres volt-e a transzformációs kísérlet. Azért próbálkoztunk PCR-es ellenőrzéssel, mert a Southern-hibridizáció nagy valószínűséggel nem adott volna pontos adatot, ha a nem-transzformáns törzsek (*A. niger* JHC 607, *A. nidulans* SZMC 0552) *cpa* génje és az *A. niger* CBS 120.49 izolátumból amplifikált *cpa* gén között igen nagy a homológia, közel 70-80 %. Viszont az *A. niger* CBS 120.49 izolátum *cpa* génjére írt specifikus primerekkel a PCR során nem kaphatunk megfelelő méretű (1096 bázispár) terméket a nem-transzformáns izolátumok (*A. niger* JHC 607, *A. nidulans* SZMC 0552) esetében. A PCR-rel történő ellenőrzés során szintén nem kaptunk megfelelő méretű terméket a transzformáns izolátumokból (T55L, T55C) sem, hasonlóan a nem-transzformáns izolátumokhoz (28. ábra).

A transzformáns izolátumok ellenőrzése során kapott eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a pANCPA vektorral bevitt *cpa* gén nem juthatott be a transzformálni kívánt *A. niger* JHC 607 és *A. nidulans* SZMC 0552 izolátumok genomjába. Ha esetleg bejutott, akkor valamilyen oknál fogva nem fejeződött ki a *cpa* gén. Vagyis a transzformációs kísérlet során csak a hygromicin B-rezisztenciagén átjuttatása és működése volt sikeres. Elképzelhető, hogy a transzformáns *A. niger* (T55L) izolátumnál kapott kismértékű OTA csökkenés nem reprezentatív, esetleg a kísérletek során kapott eredmények szórásáról lehet szó.

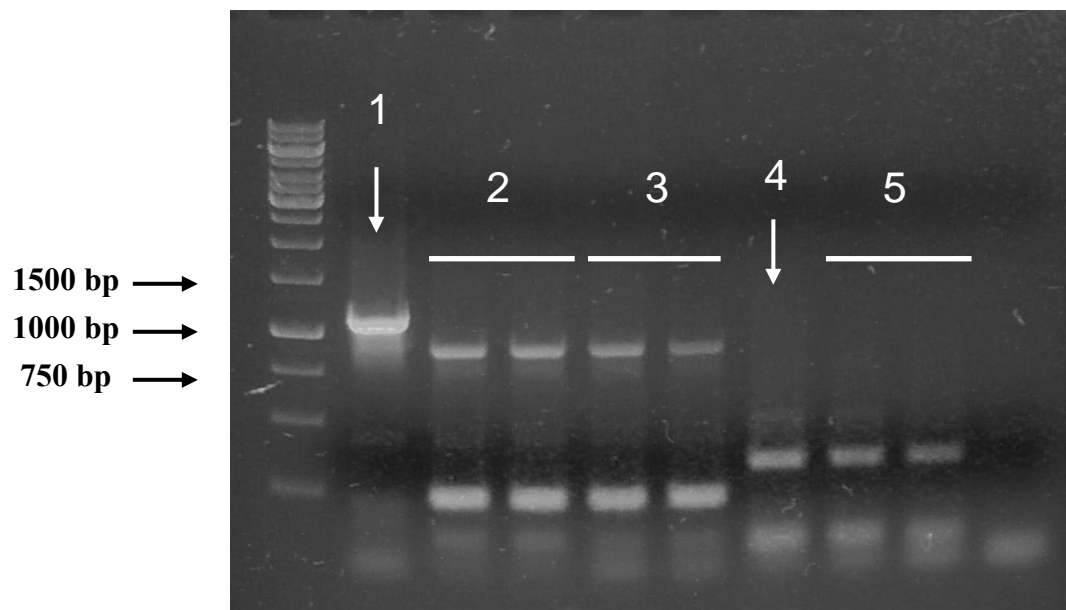


(a)



(b)

27. ábra: Az ochratoxin A-bontó képesség ellenőrzésének vékonyréteg kromatogrammjá (TLC). **(a)** Az ochratoxin A-bontó *Aspergillus niger* CBS 120.49 törzs, a nem-transzformáns és transzformáns (T55L) *Aspergillus niger* JHC 607 törzs ochratoxin A-bontása. **(b)** A nem transzformáns és a transzformáns (T55C) *Aspergillus nidulans* (SZMC 0552/WT0307) törzsek ochratoxin-bontása. Az egy izolátumhoz tartozó 6 folt a kétnaponta (1., 3., 5., 7., 9., 11. nap) vett minták extraktumának felel meg. **S:** standard ochratoxin A (2 μ g), **K:** kontroll minta, mely csak a hozzáadott ochratoxin A-t tartalmazta.



28. ábra: A transzfóráns *Aspergillus niger* T55L és *Aspergillus nidulans* T55C törzsek ellenőrzésének gélelektroforetikus képe. **1:** *Aspergillus niger* CBS 120.49 (pozitív kontroll), **2:** nem-transzfóráns *Aspergillus niger* JHC 607, **3:** transzfóráns *Aspergillus niger* T55L, **4:** nem-transzfóráns *Aspergillus nidulans* SZMC 0552, **5:** transzfóráns *Aspergillus nidulans* T55C. Marker: 1kb DNA ladder (Fermentas).

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikotoxinok a gombák másodlagos anyagcseretermékei, melyek az állatokra és az emberekre nézve egyaránt ártalmasak. Az élelmiszerek és az állati takarmányok mikotoxin-szennyezettsége ma is világméretű problémát jelent. Gazdasági és egészségügyi szempontból az egyik legjelentősebb mikotoxin az ochratoxin A (OTA), melyet több *Aspergillus* és *Penicillium* faj is termel. Számos mezőgazdasági termékben (pl. kakaó, kávé, fűszerek, gabonafélék) előfordulhatnak ochratoxinok. A mikotoxinok egészségügyi határértékeit az Európai Unión belül az Európai Bizottság (EC) határozta meg, ezen kívül számos ország rendelkezik saját egészségügyi határértékkel. Állati és emberi egészségügyi szempontból az ochratoxinok hepato- és nefrotoxikus, valamint karcinogén tulajdonságokkal rendelkeznek. Számos eljárást fejlesztettek ki a mikotoxinok eltávolítására, melyek lehetnek fizikai, fizikokémiai, kémiai és biológiai detoxifikáló eljárások. A biológiai eljárások esetében számos mikroorganizmust vizsgáltak már, hogy képes-e az OTA-t lebontani, vagy átalakítani nem toxikus ochratoxin α -vá, vagy más kevésbé toxikus vegyületekké.

Munkánk során egy a környezet számára kíméletesebb dekontaminációs eljárás (biológiai módszer) kifejlesztése volt a cél, mely lehetővé tenné a mezőgazdasági termények/termékek mikotoxin-szennyezettségének csökkentését. Kezdeti lépésként a célunk az volt, hogy olyan atoxikus fajokat keressünk, melyek képesek az OTA lebontására. *Rhizopus* és a *Phaffia/Xanthophyllomyces* izolátumokat vizsgáltuk, hogy rendelkeznek-e OTA-bontó képességgel. Elsőként 51 *Rhizopus* izolátumot teszteltünk, melyek közül 15 izolátum képes az OTA bontásra. A jól bontó izolátumok közül kettőt (*Rhizopus stolonifer* Rh5, *Rh. microsporus* Rh31) kiválasztottuk a toxinbontás kinetikájának részletes elemzése céljából. Ezen kísérletekhez összehasonlításként az *Aspergillus niger* CBS 120.49 törzset is felhasználtuk, mivel korábban már e törzs bontási kinetikáját részletesen megvizsgálták. Kísérleti eredményeink kimutatták, hogy a *Rhizopus* izolátumok az OTA 90%-át csak 12-14 nap elteltével voltak képesek elbontani, míg az *A. niger* az OTA 90%-át 6 napos inkubáció alatt volt képes degradálni. A vizsgált két *Rhizopus* izolátum (Rh 5, Rh 31) toxinbontása között nem tapasztaltunk jelentős eltéréseket. Ezen kívül kíváncsiak voltunk, hogy a két *Rhizopus* Rh 5, Rh 31 és az *A. niger* CBS 120.49 izolátumok képesek-e az OTA-bontásra természetes körülményeket modellező kísérleti rendszerben: a toxinbontást nem tápoldatban, hanem benedvesített búzaszemeken teszteltük. A modellkísérleti eredmények alapján elmondhatjuk, hogy

mindhárom izolátum szemmel láthatóan jól növekedett a szubsztrátumon, de a két *Rhizopus* izolátum közül csak az egyik (*Rh. stolonifer* Rh 5) volt képes lecsökkenteni a toxintartalmat természetes körülményeket modellező kísérlet során. Az *A. niger* CBS 120.49 izolátum, mely tápfolyadékos kísérletekben a legjobb toxinbontónak bizonyult, nem volt képes lebontani az OTA-t. A HPLC-kísérletek is alátámasztották, hogy 14 nap inkubálás után búzán a bevitt OTA 96,5%-át lebontotta a *Rh. stolonifer* (Rh 5) izolátum. A *Rh. stolonifer* Rh 5 izolátum megfelelőnek bizonyulhat ipari célokra történő felhasználásra, mely ígéretes biológiai detoxifikáló eljárás lenne a szennyezett mezőgazdasági termékekre nézve. A módszer optimalizálásához további kísérletek szükségesek.

A *Rhizopus* izolátumokon kívül megvizsgáltuk még néhány *Phaffia/Xanthophyllomyces* élesztő-izolátum OTA-bontó képességét is. Kezdeti kísérletek során három *Phaffia/Xanthophyllomyces* élesztő-izolátumot (CBS 5905, CBS 5908, CBS 6938) alkalmaztunk az OTA-bontó képesség vizsgálatára. A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy az élesztő-izolátumok kevesebb, mint 10 nap alatt lebontják vagy adszorbeálják az OTA-t PM tápoldatból. A vizsgált izolátumok közül is a *Ph. rhodozyma* CBS 5905 izolátum bizonyult a legjobbnak, ezért a későbbiekben már csak ezzel az izolátummal dolgoztunk tovább. E törzzsel elvégeztük az OTA bontási kinetikájának vizsgálatát, melynek eredményei alapján a *Ph. rhodozyma* CBS 5905 izolátum a 7. napon az OTA-mennyiség 50%-át lebontotta a PM tápoldatból, és további 7 nap után a teljes toxinmennyiség 90%-át bontotta le. A sejtextraktumból kiderül, hogy az első két napban a *Phaffia* élesztősejtek a lebontás mellett adszorbeálják az OTA-mennyiség egy részét, majd az adszorpció is folyamatosan csökken. Tehát a *Ph. rhodozyma* izolátum az OTA-bontó képessége mellett OTA-adszorbeáló képességgel is rendelkezik, mely élesztők esetében a szakirodalom szerint általános jelenség. Az OTA-bontási kinetikájának vizsgálatán kívül még számos kísérletet végeztünk el annak tisztázására, hogy milyen hatással van a különböző hőmérséklet, az inkubációs idő hosszúsága és a növekvő sejtkoncentráció az OTA-degradációra és adszorpcióra. Megvizsgáltuk, hogy az OTA-bontásért felelős enzim extracellulárisan vagy intracellulárisan választódik-e ki. A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a *Ph. rhodozyma* izolátum OTA bontása 25 és 35°C között a legnagyobb és a bontásért felelős enzim(ek) aktivitása egészen 60°C-ig megmaradt, annak ellenére, hogy a *Ph. rhodozyma* izolátum optimális növekedéséhez szükséges hőmérséklet 20°C. Érdekes, hogy az OTA degradáció 20°C-on jóval elmaradt a 25 és 35°C-on tapasztalthoz képest. A 60°C feletti hőmérsékleteken az OTA-degradáció helyett inkább az OTA-adszorpció vette át a szerepet. A *Ph. rhodozyma* izolátum OTA-adszorpciójára irányuló kísérletek során

összehasonlítottuk az élő és a hőkezelt élesztősejtek OTA-adszorbeáló képességét négyféle sejtkoncentráció (10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} sejt/ml) esetében. Azt tapasztaltuk, hogy a hőkezelt élesztősejtek esetében jelentősebb volt az OTA-adszorpció, mint az élő sejteknél. Emellett pozitív összefüggést tapasztaltunk a hőkezelt élesztősejtek toxinmegkötő képessége és a növekvő sejtkoncentráció között. Az élő sejtek esetében nem tapasztaltunk összefüggést az OTA-adszorpció és a növekvő sejtkoncentráció között. Azon kísérletekből, melyek az OTA-bontásért felelős enzim extracellulárisan vagy intracellulárisan történő kiválasztódásának vizsgálatára irányultak, azt az eredményt kaptuk, hogy feltételezhetően az enzim(ek) nem választódnak ki a fermentlébe, hanem ez az enzim(ek) sejthez kötöttek lehetnek. Irodalmi adatok és a *Ph. rhodozyma* izolátum OTA-bontásának HPLC-analízise alapján azt feltételeztük, hogy az OTA-bontásért egy karboxipeptidáz enzim lehet a felelős. Ebből kiindulva megvizsgáltuk, hogy milyen hatással vannak a különböző karboxipeptidáz inhibitorok az OTA bontására nézve *Ph. rhodozyma* izolátum esetében. A különböző karboxipeptidáz inhibitorok (karboxipeptidáz inhibitor burgonyából, teljes mini proteáz inhibitoroktól-tabletta, EDTA, EGTA és 1,10-fenantrolin) közül csak kettő bizonyult hatásosnak, ez a kettő kelátoló ágens (EDTA, 1,10-fenantrolin) melyek jelentősen gátolták az OTA bontását az élesztősejtek esetében. Ebből arra következtettünk, hogy a degradációt végző enzim feltehetően egy metalloproteáz, melynek működéséhez nem Ca^{2+} ion szükséges, mivel a EGTA nem volt hatással a OTA-bontásra *Ph. rhodozyma* izolátum esetében. További kísérleteket tervezünk az OTA-bontásért felelős folyamatok hátterének felderítése céljából a *Ph. rhodozyma* izolátum esetében, mivel jó OTA-bontó és adszorbeáló képességgel rendelkezik.

Ezen munkákkal párhuzamosan elvégeztük a bontásért felelős enzim (karboxipeptidáz A) génjének azonosítását és klónozását a már korábban OTA-bontóként azonosított *A. niger* CBS 120.49 törzsből. Korábbi irodalmi adatok alapján azt feltételeztük, hogy az OTA bontásáért egy karboxipeptidáz lehet a felelős az *A. niger* CBS 120.49 izolátum esetében is. Meghatároztuk, hogy az *A. niger cpa* gént kódoló régió 3287 bp hosszúságú, a kódoló szakasz hossza 1939 bp, amely egy 72 bp intront tartalmaz és egy 621 aminosavból álló fehérjét határoz meg. A gén kódoló szekvenciája mellett egy 648 bp hosszúságú promótert és egy 700 bp hosszúságú terminális régiót is meghatároztunk. Az alaphipotézisünket, melynek értelmében egy karboxipeptidáz enzim lehet felelős az OTA bontásáért az *A. niger* CBS 120.49 izolátum esetében, további két kísérletsorozat elvégzésével próbáltuk meg alátámasztani.

1. Bejuttattuk a *cpa* gént kódoló szekvenciát a *Pichia pastoris* élesztőfaj transzformálásához szükséges pPICZ α -A vektorba. Ellenőriztük, hogy a *Pichia pastoris* KM71H törzs rendelkezik-e OTA-bontó vagy adszorbeáló képességgel. Azt tapasztaltuk, hogy a *Pichia* élesztősejtek nem rendelkeznek OTA-bontó képességgel, viszont képesek az OTA kismértékű adszorpciójára. Elvégeztük a *Pichia pastoris* KM71H törzs transzformálását a *cpa* gént tartalmazó pPICZ α -A vektorral. Ezután elvégeztük a *cpa* gén expresszáltatását transzformáns *Pichia pastoris* KM71H törzsekben. A *cpa* gén expresszáltatását követően megvizsgáltuk, hogy esetlegesen a natúr fermentlébe kijutott karboxipeptidáz enzimfehérje képes-e az OTA bontására. Az ellenőrző vizsgálatok során megállapítottuk, hogy sikeres volt a *Pichia pastoris* KM71H törzs transzformálása a *cpa* gént tartalmazó pPICZ α -A vektorral. Viszont nem sikerült kimutatni a natúr fermentléből a karboxipeptidáz enzimfehérjét, feltehetően nem jutott ki az élesztősejtből.

2. Kidolgoztunk egy transzformációs kísérletet a nem toxinbontó *Aspergillus* törzsek pANCPA vektorral történő transzformálására. Megterveztük és elkészítettük a pANCPA vektort, mely tartalmazta a *cpa* gént *trpC* promóterrel és terminális régióval, és a *hygB^R* gént tartalmazó kazettát (szelekciós marker). A transzformációs kísérleteket megelőzően meghatároztuk a nem toxinbontó *Aspergillus* törzsek minimális gátló koncentrációját (MIC) hygromicin B antibiotikumra. Az *A. niger* JHC 607 izolátum esetében a MIC-érték 150 μ g/ml, az *A. nidulans* SZMC 0552 esetében pedig 300 μ g/ml volt. Ezt követően elvégeztük a nem toxinbontó *Aspergillus* törzsek pANCPA vektorral történő transzformációját. A transzformáns *Aspergillus* izolátumokkal (T55L, T55C) elvégeztünk egy teszt-kísérletet, hogy a transzformációt követően rendelkeznek-e az OTA-bontó képességével. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a transzformáns *Aspergillus* izolátumok (T55L, T55C) rendelkeznek a *hygB^R* génnel, de a *cpa* gén nem jutott át a transzformáció során, esetleg nem fejeződött ki a későbbiekben, mivel nem történt OTA-bontás.

Alaphipotézisünket, mely szerint egy karboxipeptidáz enzim lehet felelős az OTA bontásáért az *A. niger* CBS 120.49 izolátum esetében, egyik kísérletsorozattal sem tudtuk alátámasztani vagy megcáfolni. További kísérleteket tervezünk, hogy megbizonyosodjunk arról valóban ez a karboxipeptidáz enzim felelős-e az OTA-bontásért az *A. niger* CBS 120.49 izolátum esetében.

8. SUMMARY

Mycotoxins are secondary metabolites of fungi, which may cause diseases in animals or humans. Mycotoxin contamination of agricultural products is a serious health hazard throughout the world. One of the most important mycotoxins is ochratoxin A (OTA), which is produced by several *Aspergillus* and some *Penicillium* species. The occurrence of OTA in several commodities (feeds, foods and beverages) is considered as a serious health hazard in view of its nephrotoxic, teratogenic, hepatotoxic and carcinogenic properties. Several strategies are available for the detoxification of mycotoxins. These can be classified as physical, chemical, physicochemical and (micro)biological approaches. Microbes or their enzymes could be applied for mycotoxin detoxification; such biological approaches are now being widely studied.

In this study, isolates belonging the genus *Rhizopus* were examined for their ability to degrade OTA in a liquid medium. Kinetics of OTA degradation was examined in some selected isolates, and model experiments using moistened wheat as substrate have also been set up to examine the applicability of the isolates for OTA degradation in cereals. A total of 51 *Rhizopus* isolates were tested for OTA degradation. A number of *Rhizopus* isolates were able to degrade OTA in liquid medium. In further, we concentrated on the *Rh. stolonifer* TJM 8A8 (Rh5) and *Rh. microsporus* NRRL 2710 (Rh31) isolates. The kinetics of OTA degradation of *Rhizopus* isolates have been examined in liquid medium, and compared to that of *A. niger* CBS 120.49 examined previously by Varga et al. 2000. TLC analysis indicated that *A. niger* could degrade more than 90 % of OTA after a 6-day incubation, while the *Rhizopus* isolates could degrade about 90 % of OTA in about 12 days. We could not observe significant differences between OTA degradation kinetics of the two *Rhizopus* isolates. In the model experiments, two *Rhizopus* isolates (*Rh. stolonifer* TJM 8A8, *Rh. microsporus* NRRL 2710) and *A. niger* CBS 120.49 were inoculated to moistened wheat grains spiked with OTA to examine whether they can degrade OTA under more natural conditions. Only the *Rh. stolonifer* isolate could degrade about 95 % of OTA on wheat. The other isolates were unable to degrade OTA under these conditions possibly because they were unable to use wheat as substrate for growth, or because this substrate did not induce the expression of the enzymes necessary for OTA decomposition. The observation that a *Rh. stolonifer* isolate is able to degrade OTA on wheat grains is promising because it might allow the biological elimination of this mycotoxin. These fungi may provide a source of enzymes which could be used for detoxification of OTA in

contaminated agricultural products. Accordingly, further studies are in progress to determine which enzymes take part in the detoxification process in *Rhizopus* isolates, and to identify the genes necessary for OTA degradation.

In this study, we also examined OTA degrading and adsorbing activities of astaxanthin-producing yeast isolates (*Phaffia rhodozyma* and *Xanthophyllomyces dendrorhous*). The data presented indicate that besides producing astaxanthin, *Ph. rhodozyma* is also able both to detoxify and to adsorb OTA at temperatures well above the temperature optimum for growth of *Phaffia* cells. One *Ph. rhodozyma* and two *X. dendrorhous* isolates have been tested for OTA degradation. All of them were able to degrade OTA in a liquid medium (PM) after less than 10 days. In the further studies, we concentrated on OTA degrading or adsorbing activities of isolate CBS 5905 of *Ph. rhodozyma*. This *Phaffia* isolate could degrade more than 90% of OTA in about 7 days at 20°C. Interestingly, a significant amount of OTA was found to be bound by the cells after two days, indicating that OTA is also adsorbed by the cells. The ferment broth of either induced or uninduced cells was unable to degrade OTA. These observations indicate that the enzyme(s) responsible for OTA degradation is not excreted into the ferment broth, so the enzyme responsible for OTA degradation is cell-bound. Our data indicate that *Ph. rhodozyma* is able to convert OTA to ochratoxin α , and this conversion is possibly mediated by an enzyme related to carboxypeptidases. Chelating agents like EDTA and 1,10-phenanthroline inhibited OTA degradation caused by *Ph. rhodozyma* indicating that the carboxypeptidase is a metalloprotease, similarly to carboxypeptidase A. The temperature optimum of this enzyme was found to be above 30°C, which is much higher than the temperature optimum for growth of *Ph. rhodozyma* cells, which is around 20°C. Both viable and heat-treated (dead) *Ph. rhodozyma* cells were also able to adsorb significant amounts of OTA. Further studies are in progress to identify the enzyme responsible for OTA degradation in *Ph. rhodozyma*.

In the course of our work, we started to identify the enzyme responsible for OTA degradation in *A. niger* CBS 120.49, which has been examined previously by Varga et al. (2000) for the kinetics of OTA degradation. We have supposed that the enzyme involved in the reaction is possibly a carboxypeptidase, as carboxypeptidase A can convert OTA to ochratoxin α . The entire *cpa* gene in *A. niger* was identified and the promoter and terminal regions of this gene were also determined. The whole *cpa* gene has been cloned and analyzed: a 3287 bp long sequence was determined. This sequence contains a 1939 bp long open reading frame and a 72 bp long intron. This ORF encodes a 621 amino acid long

protein. Besides the coding region, the 648 bp long promoter region and the 700 bp long terminal region were determined as well. We have supposed that a carboxypeptidase is responsible for OTA degradation in *A. niger*, and tried to verify this with two transformation experiments.

1. Transformation of *Pichia pastoris* isolate: In this experiment, the isolated *cpa* gene was inserted into the pPCIZ α vector, which was used in the transformation of the *Pichia pastoris* KM71H isolate. Before the transformation process, we tested that *Pichia pastoris* isolates have ability of OTA degradation. The results showed that these isolates were unable to degrade OTA in liquid medium, but they had low ability of OTA adsorption. We carried out the expression of *cpa* gene in transformant *Pichia pastoris* isolates. Then we have tested whether the carboxypeptidase protein was secreted into the natural broth and whether it was able to degrade OTA. The results showed that this protein was not secreted into the natural broth or presented low quantities.

2. Transformation of atoxigenic *A. niger* (JHC 607) and *A. nidulans* (SZMC 0552) isolates: We have created a transformation vector (pANCPA), which contains the *cpa* gene and the hygromycin B resistance gene as selection marker. Along with the *cpa* gene, *trpC* promoter and *trpC* terminal regions were inserted to the transformation vector. Before the transformation process, the minimal inhibitory concentration (MIC) values for hygromycin B of *A. niger* JHC 607 and *A. nidulans* SZMC 0552 isolates were determined. These hygromycin B concentrations were used in the transformation system. After the successful transformation, we tested these isolates (*A. niger* T55L, *A. nidulans* T55C) whether they were able to degrade OTA in liquid medium. The result showed that these transformants were unable to degrade OTA in liquid medium. We suppose that the *cpa* gene was not integrated into the genom of *A. niger* and *A. nidulans*, or it was not expressed in these isolates.

We initially supposed that a carboxypeptidase is responsible for OTA degradation in *A. niger* CBS 120.49. This hypothesis was not confirmed or disproved. We are planning further experiments to confirm that this enzyme is responsible for OTA degradation.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- ABARCA, M.L., BRAGULAT, M.R., CASTELLA, G. AND CABANES, F.J. (1984) Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2650-2652.
- ABRUNHOSA, L. AND VENANCIO, A. (2007) Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* 29: 1909-1914.
- ABRUNHOSA, L., SANTOS, L. AND VENANCIO, A. (2006) Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnology* 20: 231-24.
- ABRUNHOSA, L., SERRA, R. AND VENANCIO, A. (2002). Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7493-7496.
- ADRIO, J.L. AND VEIGA, M. (1995) Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Techniques* 9: 509-512.
- AKIYAMA, H., TOYODA, M., KATO, M., IGIMI, S. AND KUMAGAI, S. (1997) The degradation of several mycotoxins by human intestinal microflora cultured by continuous flow culture system. *Mycotoxins* 44: 21-27.
- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W. AND BLACKWELL, M. (1996) *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons, New York.
- ANDREWES, A.G., PHAFF, H.J., STARR, M.P. (1976) Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15: 1003-1007.
- ANGIONI, A., CABONI, P., GARAU, A., FARRIS, A., ORRO, D., BUDRONI, M. AND CABRAS, P. (2007) *In vitro* interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2043-2048.
- ARBILLAGA, L., AZQUETA, A., EZPELETA, O. AND LOPEZ DE CERAIN, A. (2007a) Oxidative DNA damage induced by ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity. *Mutagenesis* 22: 35-42.
- ARBILLAGA L., AZQUETA A., VAN DELFT J.H. AND LOPEZ DE CERAIN, A. (2007b) *In vitro* gene expression data supporting a DNA non-reactive genotoxic mechanism for ochratoxin A. *Toxicology and Applied Pharmacology* 220: 216-224.
- BALLANCE, D.J. (1990) Transformation systems for filamentous fungi and an overview of fungal gene structure. In: Leong SA and Berka RM (Eds) *Molecular Industrial Mycology*, Dekker, New York, pp 1-29.
- BARNA-VETRÓ, I., SOLTÍ, L., TÉREN, J., GYÖNGYÖSI, Á., SZABÓ, E. AND WÖLFLING, A. (1996) Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 4071-4074.
- BATTILANI, P., GIORNI, P. AND PIETRI, A. (2003) Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology* 109: 715-722.
- BEJAOU, H; MATHIEU, F; TAILLANDIER, P; LEBRIHI, A (2006) Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a

- potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiology Letters*, 255: 203-208.
- BEJAOU, H; MATHIEU, F; TAILLANDIER, P; LEBRIHI, A (2004) Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1038-1044.
- BERKA, R.M., DUNN-COLEMAN, N. AND WARD, M. (1992) Industrial enzymes from *Aspergillus* species, In *Aspergillus. Biology and Industrial Applications*. Bennett, J.W. and Klich., M.A. (ed.), Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 155-202.
- BINDER, M, AND HIBBETT, D.S. (2002) Higher-level phylogenetic relationships of homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 76-90.
- BORGIDA, L.P., GUYONVARCH, A.M., LEBRIHI, A., AND MATHIEU, F. (2003) Method for the detection of ochratoxin A- or citrinin-producing fungi. *European Patent*, No. 1 329 521 A1.
- BÖHM J., GRAJEWSKI J., ASPERGER H., CECON B., RABUS B. AND RAZZAZI E. (2000) Study on biodegradation of some A- and B-trichothecenes and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms. *Mycotoxin Research* 16A: 70–74.
- BRIDGE, P.D., HAWKSWORTH, D.L., KOZAKIEWICZ, Z., ONIONS, A.H.S., PATERSON, R.R.M., SACKIN, M.J., SNEATH, P.H.A. (1989) A reappraisal of terverticillate *Penicillia* using biochemical, physiological and morphological features. I. Numerical taxonomy. *Journal of General Microbiology* 135: 2941-2966.
- BREDDAM, K. (1986) Serine carboxypeptidases. A review, *Carlsberg Research Communication*. 51: 83–128.
- BUCHELI, P., MEYER, I., PITTET, A., VUATAZ, G., AND VIANI, R. (1998) Industrial storage of green robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4507-4511.
- BUERSTMAYR, H, LEMMENS, M, HARTL, L, DOLDI, L, STEINER, B, STIERSCHNEIDER, M, AND RUCKENBAUER, P (2002) Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. 1. Resistance to fungal spread (Type 11 resistance). *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 84-91.
- BUERSTMAYR, H, STEINER, B, HARTL, L, GRIESSER, M, ANGERER, N, LENGAUER, D, MIEDANER, T, SCHNEIDER, B, AND LEMMENS, M. (2003) Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. 11. Resistance to fungal penetration and spread. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 503-508.
- BURDITT, S.J., HAGLER, W.M. JR, AND HAMILTON, P.B. (1984) Feed refusal during ochratoxicosis in turkeys. *Poultry Science*, 63: 2172-2174.
- CASTILLO, A. AND CIFUENTES, V. (1994) Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Current Genetics*, 26: 364–368.
- CHELKOWSKI, J., DOPIERALA, G., GODLEWSKA, B., RADOMYSKA, W., AND SZEBIOTKO, K. (1981) Mycotoxins in cereal grain. Part III. Production of ochratoxin A in different varieties of wheat, rye and barley. *Food* 25: 625-629.
- CHOWDHARY, A., AND K. SINGH. (2005) Spectrum of fungal keratitis in North India. *Cornea*, 24: 8-15.

- CIEGLER, A., FENNELL, D. J., MINTZLAFF, H. J., AND LEISTNER, L. (1972) Ochratoxin synthesis by *Penicillium* species. *Naturwissenschaften* 59: 365-366.
- CLARK, H.A., SNEDEKER, S.M. (2006) Ochratoxin A: its cancer risk and potential for exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 9: 265-296.
- CLEVELAND, T.E., DOWD, P.F., DESJARDINS, A.E., BHATNAGAR, D., AND COTTY, P.J. (2003) United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Management Science*, 59: 629-642.
- COTTY, P.J., BAYMAN, P., EGEL, D.S. AND ELIAS, K.S. (1994) Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In: *The Genus Aspergillus, From Taxonomy and Genetics to Industrial Applications*. Powell, K.A., Renwick, A. and Peberdy, J.F. (ed.), Plenum Press, New York, pp. 1-27.
- DAL-DEGAN, F., RIBADEAU-DUMAS, B. AND BREDDAM, K. (1992) Purification and characterization of two serine carboxypeptidases from *Aspergillus niger* and their use in C-terminal sequencing of proteins and peptide synthesis, *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2144-2152.
- DAO, H.P., MATHIEU, F. & LEBRIHI, A. (2005) Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 61-67.
- DEBERGHES, P., BETBEDER, A. M., BOISARD, F., BLANC, R., DELABY, J. F., KRIVOBOK, S., STEIMAN, R., SEIGLE-MURANDI, F., AND CREPPY, E. E. (1995) Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. *Mycotoxin Research*, 11: 37-47.
- DEGELMANN, P., BECKER, M., HERDERICH, M., AND HUMPF, H.U. (1999) Determination of ochratoxin A in beer by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 49: 543-546.
- DiSANTO, M.E., LI, Q. AND LOGAN, D.A. (1992) Purification and characterization of a developmentally regulated carboxypeptidase from *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology*, 174: 447-455.
- DOBSON, A., AND O'CALLAGHAN, J. (2004) Detection of ochratoxin A producing fungi. *Patent No. WO 2004/072224 A2*.
- DUVICK, J. (2001) Prospects for reducing fumonisin contamination of corn through genetic modification. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl2): 337-342.
- COMMISSION REGULATION (EC) No.123/2005 of 26 January 2005 (Official Journal of European Union) [<http://www.foodstandards.gov.uk>]
- EDWARDS, S.G, O'CALLAGHAN, J., AND DOBSON, A.D.W. (2002) PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic Fungi. *Mycological Research*, 106: 1005-1025.
- ELLIS, J.J. (1985) Species and varieties in the *Rhizopus arrhizus-Rhizopus oryzae* group as indicated by their DNA complementarity. *Mycologia* 77: 243-247.
- ELLIS, J.J. (1986) Species and varieties in the *Rhizopus microsporus* group as indicated by their DNA complementarity. *Mycologia* 78: 508-510.
- ENDRIZZI, J.A., BREDDAM, K. AND REMINGTON, S.J. (1994) Structure of yeast serine carboxypeptidase. *Biochemistry* 33: 11106-11120.

- ENGELHARDT, G. (2002) Degradation of ochratoxin A and B by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Mycotoxin Research*, 18: 37–43.
- ÉLELMISZERVIZSGÁLATI KÖZLEMÉNYEK (2007) Élelmiszerminőség – Élelmiszerbiztonság 53. kötet / különszám.
- FAO (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO, Rome.
- FAUCET, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., DAI, J., CASTEGNARO, M., MANDERVILLE, R.A. (2004) Evidence for covalent DNA adduction by ochratoxin A following chronic exposure to rat and subacute exposure to pig. *Chemical Research in Toxicology*, 17: 1289-1296.
- FRISVAD, J.C., FRANK, J.M., HOUBRAKEN, J.A.M.P., KUIJPERS, A.F.A., AND SAMSON, R.A. (2004) New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 50: 23-43.
- FUNGARO, M.H., VISSOTTO, P.C., SARTORI, D., VILAS-BOAS, L.A., FURLANETO, M.C., AND TANIWAKI, M.H. (2004) A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. *Current Microbiology*, 49: 123-127.
- FUTAMURA, K., SHIRAI, S., AND MAJIMA, A. (1988) Effects of ochratoxin A on Cts mice (II). Causes of lens capsule deformities. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 92: 462-467.
- GALTIER, P., AND ALVINERIE, M. (1976) *In vitro* transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Animal Research Reviews*, 7: 91-98.
- GALTIER, P., ALVINERIE, M. AND CHARPENTEAU, J.L. (1981) The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and Cosmetics Toxicology*, 19:735-738.
- GAMS, W., CHRISTENSEN, M., ONIONS, A.H.S., PITT, J.I. AND SAMSON, R.A. (1985) Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics. Samson, R.A. and Pitt, J.I. (ed.), Plenum Press, New York, pp. 55-62.
- GAREIS, M., MÄRTLBAUER, E., BAUER, J., GEDEK, B. (1988) Bestimmung von Ochratoxin A in Muttermilch. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung*, 186: 114-117.
- GEISEN, R. (2004) Molecular monitoring of environmental conditions influencing the induction of ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium nordicum*. *Molecular Nutrition and Food Research* 48:532-540.
- GEISEN, R., SCHMIDT-HEYDT, M. AND KAROLEWIEZ, A. (2006) A gene cluster of ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. *Mycotoxin Research*, 22:134-141.
- GOLUBEV, W. (1995) Perfect state of *Rhodymyces dendrorhous* (X. *dendrorhous*). *Yeast* 11: 101-110.
- GUPTA, M., BANDOPADHYAY, S., PAUL, B., AND MAJUMDER, S.K. (1979) Hematological changes produced in mice by ochratoxin A. *Toxicology* 14: 95-98.
- HAMER, J.E., AND TIMBERLAKE, W.E. (1987) Functional organization of the *Aspergillus nidulans* trpC promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 7: 2352–2359.
- HAUGLAND, R.A., VARMA, M., WYMER, L.J., AND VESPER, S. (2004) Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 198-210.

- PEL, H.J., WINDE, J.H., ARCHER, D.B., DYER, P.S., HOFMANN, D., SCHAAP, P.J., TURNER, G., VRIES, R.P., ALBANG, R., ALBERMANN, K., ANDERSEN, M.R., BENDTSEN, J.D., BENEN, J.A.E., VAN DEN BERG, M., BREESTRAAT, S., CADDICK, M.X., CONTRERAS, R., CORNELL, M., COUTINHO, P.M., DANCHIN, E.G.J., DEBETS, A.J.M., DEKKER, P., VAN DIJCK, P.W.M., VAN DIJK, A., DIJKHUIZEN, L., DRIESSEN, A.J.M., D'ENFERT, C., GEYSENS, S., GOOSEN, C., GROOT, G.S.P., GROOT, P.W.J., GUILLEMETTE, T., HENRISSAT, B., HERWEIJER, M., VAN DEN HOMBERGH, J.P.T.W., VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J., VAN DER HEIJDEN, R.T.J.M., VAN DER KAAIJ, R.M., KLIS, F.M., KOOLS, H.J., KUBICEK, C.P., VAN KUYK, P.A., LAUBER, J., LU, X., VAN DER MAAREL, M.J.E.C., MEULENBERG, R., MENKE, H., MORTIMER, M.A., NIELSEN, J., OLIVER, S.G., OLSTHOORN, M., PAL, K., VAN PEIJ, N.N.M.E., RAM, A.F.J., RINAS, U., ROUBOS, J.A., SAGT, C.M.J., SCHMOLL, M., SUN, J., USSERY, D., VARGA, J., VERVECKEN, W., VAN DE VONDERVOORT, P.J.J., WEDLER, H., WOËSTEN, H.A.B., ZENG, A., VAN OOYEN, A.J.J., VISSER, J. AND STAM, H. (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88 *Nature Biotechnology* vol.25, 2: 221-231.
- HOLZAPFEL, W., BROST, I., FARBER, P., GEISEN, R., BRESCH, H., JANY, K.D., MENGU, M., JAKOBSEN, M., STEYN, P.S., TENIOLA, D., AND ADDO, P. (2002) Actinomycetes for breaking down aflatoxin B1, ochratoxin A, and/or zearalenon. *International patent No.* WO 02/099142 A3.
- HORN, B.W., GREENE, R.L., SORENSSEN, R.B., BLANKENSHIP, P.D., AND DORNER, J.W. (2001) Conidial movement of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in peanut fields following application to soil. *Mycopathologia*, 151: 81-92.
- HUA, S.S.T. (2003) Reduction of aflatoxin in pistachio through biological control of *Aspergillus flavus*. California Pistachio Commission 2002 *Production Research Reports*, p. 197-202. Fresno, CA.
- HUFF, W.E., DOERR, J.A., HAMILTON, P.B. (1979) Decreased glycogen mobilization during ochratoxicosis in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 37: 122-126.
- HULT, K., TEILING, A., GATENBECK, S. (1976) Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Applied and Environmental Microbiology*, 32: 443-444.
- HULT, K., AND GATENBECK, S. (1976) A spectrophotometric procedure, using carboxypeptidase A, for the quantitative measurement of ochratoxin A. *Journal Association of Official Analytical Chemistry*, 59: 128-129.
- HUNT, D.C., MCCONNIE, B.R., AND CROSBY, N.T. (1980) Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatisation and high-performance liquid chromatography. *Analyst*, 105: 89-90.
- HWANG, C.-A., AND DRAUGHON, F.A. (1994) Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection*, 57: 410-414.
- IARC (1993) Ochratoxin A. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol.56, Lyon: *IARC Press*, pp. 489-521.
- JOHN, E., HAMER, AND WILLIAM, E., TIMBERLAKE, (1987) Functional organization of the *Aspergillus nidulans* trpC promoter. *Molecular and Cellular Biology* 7: 2352-2359.
- JOHNSON, E.A. (2003) *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *International Microbiology*, 6: 169-174.

- JOHNSTON, M., ANDREWS, S., BRINKMAN, R., COOPER, J., DING, H., DOVER, J., DU, Z., FAVELLO, A., FULTON, L., GATTUNG, S., GEISEL, C., KIRSTEN, J., KUCABA, T., HILLIER, L., JIER, M., JOHNSTON, L., LANGSTON, Y., LATREILLE, E. J., LOUIS, E. J., MACRI, C., MARDIS, E., MENEZES, S., MOUSER, L., NHAN, M., RIFKIN, L., RILES, L., ST. PETER, H., TREVASKIS, E., VAUGHAN, K., VIGNATI, D., WICOX, L., WOHLDMAN, P., WATERSTON, R., WISON, R., AND VAUDIN, M. (1994) Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII. *Science* 265: 2077-2081.
- JOSHI L. AND ST LEGER R.J. (1999) Cloning, expression, and substrate specificity of MeCPA, a zinc carboxypeptidase that is secreted into infected tissues by the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae*, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 9803–9811.
- KANISAWA, M., SUZUKI, S., MOROI, K. (1990) The mode of action of ochratoxin A in acute enteritis in rats. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 10: 56-63.
- KARLOVSKY, P. (1999) Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins*, 7: 1-23.
- KERKADI, A., BARRIAULT, C., MARQUARDT, R.R., FROHLICH, M., YOUSEF, I.M., ZHU, X.X., AND TUCHWEBER, B. (1999) Cholestyramine protection against ochratoxin A toxicity: role of ochratoxin A sorption by the resin and bile acid enterohepatic circulation. *Journal of Food Protection*, 62: 1461-1465.
- KOVÁCS, F., SÁNDOR, G., VÁNYI, A., DOMÁNY, S., AND ZOMBORSZKY-KOVÁCS, M. (1995) Detection of ochratoxin A in human blood and colostrum. *Acta Veterinaria Hungarica*, 43: 393-400.
- KOVÁCS, F. (2001): Penészgombák - mikotoxinok. In Penészgombák, mikotoxinok a táplálékláncban. Szerk: Kovács F. MTA Agrártudományok Osztálya, Budapest, pp. 13-20.
- KREDICS, L., VARGA, J., KOCSUBE, S., DÓCZI, I., SAMSON, R.A., RAJARAMAN, R., NARENDHAN, V., BHASKAR, M., VÁGVÖLGYI, CS. AND MANIKANDAN, P. (2007) Case of Keratitis Caused by *Aspergillus tamarii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 3464-3467.
- KROGH, P., HALD, B., PLESTINA, R., AND CEOVIC, S. (1977) Balkan (endemic) nephropathy and food-borne ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuff. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B*, 85: 238-240.
- KUCSERA, J., PFEIFFER, I., AND FERENCZY, L. (1998) Homothallic life cycle in the diploid red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*), *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73: 163-168.
- LAKSHMI, P., VARADARAJALU, NARAYAN, AND PUNEKAR, S. (2005) Cloning and use of sC as homologous marker for *Aspergillus niger* transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 61: 219-224.
- LA PENNA, M., NESCI, A., AND ETCHEVERRY, M. (2004) *In vitro* studies on the potential for biological control on *Aspergillus* section *Flavi* by *Kluyveromyces* spp. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 257-264.
- LIU, G.Y., CHEN, C.C., YUAN, G.F., AND CHIEN, C.Y. (2001) A taxonomic study of the genus *Rhizopus* by isozyme patterns. *Nova Hedwigia* 72: 231-239.

- LIU, G.Y., CHEN, S.R., WEI, Y.H., LEE, F.L., FU, H.M., YUAN, G.F., AND STALPERS, J.A. (2007) Polyphasic approach to the taxonomy of the *Rhizopus stolonifer* group. *Mycological Research* 3: 196-203.
- LO CURTO, R., PELLICANO, T., VILASI, F., MUNAFO, P., AND DUGO, G. (2004) Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments of grapes. *Food Chemistry*, 84: 71-75.
- MALARDIER, L., DABOUSSI, M.J., JULIEN, J., ROUSSEL, F., SCAZZOCCHIO, C. AND BRYGOO, Y. (1989) Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene*, 78: 147-156.
- MARQUARDT, R.R., FROHLICH, A.A. (1992) A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science*, 70: 3968-3988.
- MESTERHAZY, A. AND BARTOK, T. (1996) Control of *Fusarium* head blight of wheat by fungicide and its effect in the toxin contamination of the grains. *Pflanzenchutz-Nachrichten Bayer*, 49: 181-198.
- MICHAILIDES, T. J. (1991) Characterization and comparative studies of *Mucor* isolates from stone fruits from California and Chile. *Plant Dis.* 75: 373-380.
- MILLER, M. W., YONEYAMA, M. AND SONEDA, M. (1976) *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomyces). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26: 286-291.
- MILLER, J.D. (1995) Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Journal of Stored Product Research*, 31: 1-16.
- MOLNAR, O., SCHATZMAYR, G., FUCHS, E., AND PRILLINGER, H. (2004) *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology*, 27:661-671.
- MORTENSEN, G.K.; STROBEL, B.W.; AND HANSEN, H.C.B. (2006) Degradation of zearalenone and ochratoxin A in three Danish agricultural soils *Chemosphere*, 62: 1673-1680.
- MOSS, M.O. (1996) Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 13 (Suppl.): 5-9.
- MOSS, M.O. (1998) Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (Suppl.): S62-S76.
- MULE, G., SUSCA, A., LOGRIECO, A., STEA, G., AND VISCONTI, A. (2006) Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111 (Suppl 1): S28-S34.
- MUNIMBAZI, C., AND BULLERMAN, L.B. (1998) Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 959-968.
- MUNKVOLD, G.P. (2003) Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in corn. *Annual Reviews of Phytopathology*, 41: 99-116.
- NAGY, Á., GARAMSZEGI, N., VÁGVÖLGYI, CS., AND FERENCZY, L. (1994) Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 123: 315-318.

- NAGY, Á., VÁGVÖLGYI, CS., AND FERENCZY, L. (1995a) Simple method for obtaining chromosomal DNA for orthogonal field alteration gel electrophoresis analysis from *Phaffia rhodozyma*. *BioTechniques* 18: 63-65.
- NAGY, Á., VÁGVÖLGYI, CS., PALÁGYI, ZS. AND FERENCZY, L. (1995b) Analysis of chromosomal DNA polymorphism of *Phaffia rhodozyma*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 42: 133.
- NAGY, Á., PALÁGYI, ZS., VÁGVÖLGYI, CS., PAPP, T. AND FERENCZY, L. (1996) Chromosomal rearrangements observed in auxotrophic and hybrid strains of *Phaffia rhodozyma*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 42: 242.
- NAGY, Á., PALÁGYI, ZS., FERENCZY, L., AND VÁGVÖLGYI, CS. (1997) Radiation-induced chromosomal rearrangement as an aid to analysis of the genetic constitution of *Phaffia rhodozyma*. *FEMS Microbiology Letters*, 152: 249-254.
- O'CALLAGHAN, J., CADDICK, M.X., DOBSON, A.D. (2003) A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*. 149: 3485-3491.
- OCHMAN, H., GERBER, A.S., HARTL, D.L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621-623.
- O'DONNELL, K., LUTZONI, F.M., WARD, T.J., AND BENNY, G.L. (2001) Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia*, 93: 286-296.
- OZPINAR, H., BILAL, T., ABAS, I., KUTAY, C. (2002) Degradation of ochratoxin A in rumen fluid in vitro. *Medicine and Biology*, 9:66-69.
- PALÁGYI, ZS., NAGY, Á., PAPP, T., FERENCZY, L., VÁGVÖLGYI, CS. (1996) Chromosomal DNA preparation from yeasts of biotechnological importance. *Biotechnology Techniques*, 10: 565-568.
- PALÁGYI, ZS., VÁGVÖLGYI, CS., NAGY, Á. AND FERENCZY, L. (1998) Carbon source utilization patterns of wild-type *Phaffia rhodozyma* isolates. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 46: 133-134.
- PALÁGYI, ZS., NAGY, Á., FERENCZY, L. AND VÁGVÖLGYI, CS. (1999) Genome typing suggests considerable natural ploidy differences in *Phaffia rhodozyma*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 46: 343.
- PALÁGYI, Z., FERENCZY, L., VÁGVÖLGYI, C. (2001) Carbon-source assimilation pattern of the astaxanthin producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 95-97.
- PALÁGYI, Z., PAPP, T., TAKÓ, M., NAGY, Á., PESTI, M. AND VÁGVÖLGYI, C. (2004) Genetic variability of astaxanthin-producing yeasts: random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phaffia rhodozyma* and *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Acta Biologica Szegediensis* 48: 35-38.
- PATIÑO, B., GONZÁLEZ-SALGADO, A., GONZÁLEZ-JAÉN, M.T. AND VÁZQUEZ, C. (2005) PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology* 104: 207-214.

- PAUL, C., NAIDOO, G., FORBES, A., MIKKILINENI, V., WHITE, D., ROCHEFORD, T. (2003) Quantitative trait loci for low aflatoxin production in two related maize populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 263-270.
- PERRONE, G., SUSCA, A., STEA, G., AND MULE, G. (2004) PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 641-649.
- PÉTERI, Z., TÉREN, J., VÁGVÖLGYI, CS. AND VARGA, J. (2007) Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*, 24:205–210.
- PETERSSON, S., AND SCHNURER, J. (1995) Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1027-1032.
- PFEIFFER, I., KUCSERA, J., VARGA, J., PÁRDU CZ, Á., FERENCZY, L. (1996) Variability and inheritance of double-stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma*. *Current Genetics*, 30: 294-297.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A. AND CASTEGNARO, M. (2005) Further arguments in favour of direct covalent binding of ochratoxin A (OTA) after metabolic biotransformation. *Food Additives and Contaminants* 22 (Suppl 1): 75-87.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A. AND MANDERVILLE R.A. (2007) Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research* 51: 61-99.
- PHAFF, H.J., MILLER, M.W., YONEYAMA, M. AND SONEDA, M. (1972) A comparative study of the yeast flora associated with trees on the Japanese islands and on the West Coast of North America. In: Terui, G. (Ed.), *Fermentation Technology Today: Proceedings of the Fourth International Fermentation Symposium*. Society of Fermentation Technology, Osaka pp. 759-774.
- PIOTROWSKA, M. AND ZAKOWSKA, Z. (2000) The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. In: Bielecki S, Tramper J, Polak J (eds) *Food biotechnology*. Elsevier, Amsterdam, pp 307–310
- PITOUT, M.J. (1969) The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 18: 485-491.
- PITT, J. I. (1987) *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 266-269.
- PITTET, A., TORNARE, D., HUGGETT, A. AND VIANI, R. (1996) Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3564-3569.
- POLITIS, I., FEGEROS, K., NITSCH, S., SCHATZMAYR, G. AND KANTAS, D. (2005) Use of *Trichosporon mycotoxinivorans* to suppress the effects of ochratoxicosis on the immune system of broiler chicks. *British Poultry Science*, 46(1): 58-65.
- RABIE, C.J., LÜBBEN, A., SCHIPPER, M.A.A., VAN HEERDEN, F.R., AND FINCHAM, J.E. (1985) Toxigenicity of *Rhizopus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 1: 263-270.

- RAMOS, A.J., HERNANDEZ, E., PLA-DELFINA, J.M. AND MERINO, M. (1996) Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. *International Journal of Pharmacology*, 128: 129-137.
- RAMOS, A.J., FINK-GREMMELS, J. AND HERNANDEZ, E. (1996) Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of non-nutritive adsorbent compounds. *Journal of Food Protection*, 59: 631-641.
- RAPER, K.B. AND FENNELL, D.I. (1965) The genus *Aspergillus*. *Williams and Wilkins Company*, Baltimore.
- RATOLA, N., BARROS, P., SIMOES, T., CERDEIRA, A., VENÂNCIO, A. AND ALVES A. (2006) Worldwide interlaboratory study on the determination of ochratoxin A in different wine type samples. *Talanta*, 70: 720-731.
- REFAI, M.K., AZIZ, N.H., EI-FAR, F. AND HASSAN, A.A. (1996) Detection of ochratoxin produced by *Aspergillus ochraceus* in feedstuffs and its control by Y radiation. *Applied Radiation and Isotopes*, 47: 617-621.
- REVERTER, D., VENTURA, S., VILLEGAS, V., VENDRELL, J. AND AVILÉS, F.X. (1998) Overexpression of human procarboxypeptidase A2 in *Pichia pastoris* and detailed characterization of its activation pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 3535-3541.
- RIBES, J.A., VANOVER-SAMS, C.L. AND BAKER, D.J. (2000) Zygomycetes in Human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 236-301.
- ROEHR, M., KUBICEK, C.P. AND KOMINEK, J. (1992) Industrial acids and other small molecules. In *Aspergillus. Biology and Industrial Applications*. Bennett, J.W. and Klich., M.A. (ed.). Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 91-131.
- ROTTER, R.G., FROHLICH, A.A. AND MARQUARDT, R.R. (1989) Influence of dietary charcoal on ochratoxin A toxicity in Leghorn chicks. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53: 449-453.
- RUHLAND, M., ENGELHARDT, G., WALLNOFER, P.R. AND SCHAFER, W. (1994) Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in wheat and maize cell suspension cultures. *Naturwissenschaften* 81: 453-454.
- SAHA, R., AND S. DAS. (2006) Mycological profile of infectious keratitis from Delhi. *Indian Journal of Medical Research*, 123: 159-164.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SAMSON, R.A., HOUBRAKEN, J.A.M.P., KUIJPERS, A.F.A., FRANK, J.M. AND FRISVAD, J.C. (2004). New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50: 45-61.
- SCHAEFFER, J.L., TYCZKOWSKI, J.K. AND HAMILTON, P.B. (1987). Alterations in carotenoid metabolism during ochratoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science*, 66: 318-324.
- SCHATZMAYR, G., HEIDLER, D., FUCHS, E. AND BINDER, E.M. (2004). Microorganism for biological detoxification of mycotoxins, namely ochratoxins and/or zearalenons, as well as method and use thereof. *US Patent No.* 20040208956.

- SCHATZMAYR, G., ZEHNER, F., TAUBEL, M., SCHATZMAYR, D., KLIMITSCH, A., LOIBNER, A.P. AND BINDER, E.M. (2006) Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50:543-51.
- SCHILTER, B., MARIN-KUAN, M., DELATOUR, T., NESTLER, S., MANTLE, P. AND CAVIN, C. (2005) Ochratoxin A: potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity. *Food Additives and Contaminants*, 22 (Suppl 1): 88-93.
- SCHIPPER, M.A.A. (1984) A revision of the genus *Rhizopus*. I The *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*. *Studies in Mycology*, 25: 1-19.
- SCHMIDT, H., BANNIER, M., VOGEL, R.F., AND NIESSEN, L. (2004a) Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 464-469.
- SCHMIDT, H., TANIWAKI, M.H., VOGEL, R.F., AND NIESSEN, L. (2004b) Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 899-909.
- SCHMIDT-HEYDT, M. AND GEISEN, R. (2007) A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. *International Journal of Food Microbiology* 117: 131-140.
- SCHOLER, H.J., MULLER, E. AND SCHIPPER, M.A.A. (1983) Mucorales. In: Howard DW (Ed) Fungi Pathogenic for Humans and Animals, *Marcel Dekker, New York*, pp 9-59.
- SCOTT, P.M. (1996) Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. *Food Additives and Contaminants*, 13 (Suppl.): 19-21.
- SHARMAN, M., MACDONALD, S. AND GILBERT, J. (1992) Automated liquid chromatographic determination of ochratoxin A in cereals and animal products using immunoaffinity column cleanup. *Journal of Chromatography A*, 603: 285-289.
- SIMPSON, T. J. (1995) Polyketide biosynthesis. *Chemistry and Industry* 11: 407-411.
- SKRINJAR, M., RASIC, J. L. AND STOJICIC, V. (1996) Lowering ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. *Folia Microbiologica*, 41: 26-28.
- SMITH, J.E. AND PATEMAN, J.A. (EDS), (1977) Genetics and Physiology of *Aspergillus*. *Acad. Press*. London
- SMITH, W.L., MOLINE, H.E. AND JOHNSON, K.S. (1979) Studies with *Mucor* species causing postharvest decay of fresh produce. *Phytopathology* 69: 865-869.
- SMITH, J.E. AND MOSS, M.O. (1985) Mycotoxins. Formation, analysis and significance. *John Wiley & Sons, Chichester, UK*.
- SOLFRIZZO, M., AVANTAGGIATO, G. AND VISCONTI, A. (1998) Use of various clean-up procedures for the analysis of ochratoxin A in cereals. *Journal of Chromatography A*, 815: 67-73.
- SOLFRIZZO, M., VISCONTI, A., AVANTAGGIATO, G., TORRES, A., AND CHULZE, S. (2001) In vitro and in vivo studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. *Mycopathologia*, 151: 147-153.
- SOLTI, L., SALAMON, F., BARNA-VETRÓ, I., GYÖNGYÖSI, A., SZABÓ, E. AND WOLFING, A. (1997) Ochratoxin content of human sera determined by a sensitive ELISA. *Journal of Analytical Toxicology*, 21: 44-48.

- SOMERS, D.J., FEDAK, G. AND SAVARD, M. (2003) Molecular mapping of novel genes controlling *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol accumulation in spring wheat. *Genome*, 46: 555-564.
- STANDER, M.A., STEYN, P.S., VAN DER WESTHUIZEN, F.H. AND PAYNE, B.E. (2001) A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chemical Research in Toxicology*, 14: 302-304.
- STANDER, M.A., BORNSCHEURER, U.T., HENKE, E. AND STEYN, P.S. (2000) Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 5736-5739.
- STEYN, P.S., TUINMANN, A.A., VAN HEERDEN, F.R., VAN ROOYEN, P.L., WESSELS, P.L. AND RABIE, C. J. (1983) The isolation, structure and absolute configuration of the mycotoxin rhizonin A, a novel cyclic heptapeptid containing N-methyl-3-(3-furyl) alanine, produced by *Rhizopus microsporus*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 47-49.
- SUSCA, A., STEA, G. AND PERRONE, G. (2007) Rapid polymerase chain reaction (PCR)-single-stranded conformational polymorphism (SSCP) screening method for the identification of *Aspergillus* section *Nigri* species by the detection of calmodulin nucleotide variations. *Food Additives and Contaminants*, 24: 1148-1153.
- TÉREN, J., VARGA, J., HAMARI, Z., RINYU, E. AND KEVEI, F. (1996) Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, 134: 171-176.
- THOMAS, P.A. (2003) Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 730-797.
- TILBURN, J., SCAZZOCCHIO, C., TAYLOR, G.G., ZABICKY-ZISSMAN, J.H., LOCKINGTON, R.A. AND DAVIES, R.W. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26: 205-221.
- TJAMOS, S.E., ANTONIOU, P.P., KAZANTZIDOU, A., ANTONOPOULOS, D.F., PAPAGEORGIOU, I. AND TJAMOS, E.C. (2004) *Aspergillus niger* and *A. carbonarius* in Corinth raisin and wine-producing vineyards in Greece: population composition, ochratoxin A production and chemical control. *Journal of Phytopathology*, 152: 250-255.
- TORELLI, E., FIRRAO, G., LOCCI, R. AND GOBBI, E. (2006) Ochratoxin A-producing strains of *Penicillium* spp. isolated from grapes used for the production of "passito" wines. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 307-12.
- TÓTH, B., KISS, R., KOCSUBÉ, S., TÉREN, J., AND VARGA, J. (2004) Real time PCR detection of fungi and their toxins in wheat. *Proceedings of the 2nd Central European Food Congress*, Budapest, Hungary.
- TRIGLIA, T., PETERSON, M.G. AND KEMP, D.J. (1988) A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Research*, 16: 8186.
- TSUBOUCHI, H., YAMAMOTO, K., HISADA, K., SAKABE, Y. AND UDAGAWA, S. (1987) Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. *Mycopathologia*, 97: 111-115.
- UENO, Y., KAWAMURA, O., SUGIURA, Y., HORIGUCHI, K., NAKAJIMA, M., YAMAMOTO, K. AND SATO, S. (1991) Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. In: Castegnaro, M., Plestina,

- R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I. N., Bartsch, H. (eds.) Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumors. *IARC Sci. Publ.*, Lyon, pp. 71-75.
- VÁGVÖLGYI, CS., HEINRICH, H., ÁCS, K. AND PAPP, T. (2004) Genetic variability in the species *Rhizopus stolonifer*, assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 181-188.
- VALENTA, H. (1998) Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A*, 815: 75-92.
- VAN GORCOM, R.F.M, PUNT, P.J. AND VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. (1994) Heterologous gene expression in *Aspergillus*, In The genus *Aspergillus*. Powell, K. A., Renwick, A. and Peberdy, J.F. (ed.) *Plenum Press*, New York, pp. 241-250.
- VARGA, J., VÁGVÖLGYI, CS., NAGY, Á. AND FERENCZY, L. (1995a) Molecular characterization of *Phaffia rhodozyma* strains. *Acta microbiologica et Immunologica Hungarica*, 42: 135.
- VARGA, J., VÁGVÖLGYI, CS., NAGY, Á., PFEIFFER, I., AND FERENCZY, L. (1995b) Isoenzyme, restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA characterization of *Phaffia rhodozyma*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 173-177.
- VARGA, J., KEVEI, É., RINYU, E., TÉREN, J. AND KOZAKIEWICZ, Z. (1996) Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4461-4464.
- VARGA, I., MATYASOKSZKY, K., AND SOHÁR, J. (2000a) Mycotoxin contamination of food items based on investigations in Hungary. *Egészségtudomány*, 44: 224-241.
- VARGA, J., RIGÓ, K. AND TÉREN, J. (2000b). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 1-7.
- VARGA, J., RIGÓ, K., TÉREN, J. AND MESTERHÁZY, Á. (2001) Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. *Cereal Research Communications*, 29: 85-92.
- VARGA, J., KISS, R., MÁTRAI, T., MÁTRAI, T., AND TÉREN, J. (2005a) Detection of ochratoxin A in Hungarian wines and beers. *Acta Alimentaria Hungarica*, 34: 381-392.
- VARGA, J., PÉTERI, ZS., TÁBORI, K., TÉREN, J. AND VÁGVÖLGYI, CS. (2005b) Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 321-328.
- VARGA, J. AND TÓTH, B. (2005c) Strategies to control mycotoxins in feeds: a review. *Acta Veterinaria Hungarica* 53: 189-203
- VARGA, J. AND KOZAKIEWICZ, Z. (2006) Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science Technology*, 17: 72-81.
- VEGA, F., POSADA, F., PETERSON, S.W., GIANFAGNA, T. AND CHAVES, F. (2006) *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia*, 98: 31-42.
- VOETZ, M. (2002) Development of specific DNA markers for characterization and quantification of ochratoxin forming mould fungi. *Brau Forum*, 17: 7-9.

- VOIGT, K., CIGELNIK, E. AND O'DONNELL, K. (1999) Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3957-3964.
- WEBSTER, J. (1986) Introduction to fungi. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- WEGST, W. AND LINGENS, F. (1983) Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiology Letters*, 17: 341-344.
- WESTLAKE, K., MACKIE, R. I. AND DUTTON, M. F. (1987) Effects of several mycotoxins on specific growth rate of *Butyrivibrio fibrisolvens* and toxin degradation *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 613-614.
- WERY, J., TER LINDE, J., DALDERUP, M.J.M., BOEKHOUT, T. AND VAN OOYEN, A.J.J. (1996) Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Yeast* 12: 641-651.
- WHITEWAY, D.E., VIRATA, R.L. AND WRISS, L.C. (1979) Mucormycosis. *Archives of Internal Medicine*, 139: 944-956.
- WICKLOW, D.T., DOWD, P.F. AND GLOER, J.B. (1994) Antiinsectan effects of *Aspergillus* metabolites. In The genus *Aspergillus*. Powell, K. A., Renwick, A. and Peberdy, J.F. (ed.) *Plenum Press*, New York, pp 93-114.
- WILSON, E.E. AND OGAWA, J.M. (1979) Fungal, bacterial and certain nonparasitic diseases of fruit and nut crops in California. *University of California, Berkeley Public Agricultural Science*, 190 p.
- WRIGHT, W.R. AND HAREIN, P.K. (1982) Effects of some mycotoxins on the Mediterranean flour moth. *Environment. Entomol.* 11: 1043-1045.
- XIAO, H., MARQUARDT, R.R., FROHLICH, A.A., PHILLIPS, G.D. AND VITTI, T.G. (1991) Effect of hay and a grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep. *Journal of Animal Science*, 69: 3706-3714.
- XIAO, H., MARQUARDT, R.R., ABRAMSON, D. AND FROHLICH, A.A. (1996) Metabolites of ochratoxins in rat urine and in culture of *Aspergillus ochraceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 648-655.
- YU, F.Y., CHI, T.F., LIU, B.H., AND SU, C.C. (2005) Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6947-6953.
- ZHENG, Z., HANNEKEN, J., HOUCHINS, D., KING, R.S., LEE, P., AND RICHARD, J.L. (2005) Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC. *Mycopathologia*, 159: 265-272.

10. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Varga Jánosnak és Dr. Vágvölgyi Csabának, hogy munkámat mindvégig támogatták és figyelemmel kísérték, értékes elméleti és gyakorlati útmutatásaikkal minden segítséget megadtak munkám sikeres elvégzéséhez.

Hálával tartozom Dr. Lukács Gyöngyinek és Dr. Nyilasi Ildikónak, akik bevezettek a molekuláris biológia rejtelmeibe és megosztották velem gyakorlati ismereteiket tanulmányaim kezdetén. Köszönöm Dr. Juhász Ákosnak, Takó Miklósnak, Dr. Galgóczy Lászlónak, Kocsubé Sándornak és Linka Beátának a sok hasznos tanácsot, ötletadó beszélgetést és a közös munkát. Köszönöm minden közvetlen munkatársamnak, a 309-es labor dolgozóinak, akik az általuk kialakított segítőkész, baráti légkörrel nagyban hozzájárultak munkám elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Téren Józsefnek, hogy lehetővé tette a HPLC és vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) kísérletek elvégzését a Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomáson, és ezekben segítségemre volt.

Köszönetemet fejezem ki Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a munkám során nyújtott technikai segítségért, valamint Dr. Palágyi Andrásnénak és Kreisch Istvánnénak, hogy a munkámmal kapcsolatos hivatalos ügyeket intézték.